

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ALBEDO SEMANGKA  
MERAH (*Citrullus vulgaris*) SEBAGAI TERAPI TIKUS  
(*Rattus norvegicus*) MODEL DIABETES MELITUS  
TIPE I YANG DIINDUKSI STREPTOZOTOCIN  
DITINJAU DARI EKSPRESI IL-1 $\beta$   
DAN HISTOPATOLOGI AORTA**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**ANANTA ARDI BAGASKARA**  
**135130107111015**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ALBEDO SEMANGKA  
MERAH (*Citrullus vulgaris*) SEBAGAI TERAPI TIKUS  
(*Rattus norvegicus*) MODEL DIABETES MELITUS  
TIPE I YANG DIINDUKSI STREPTOZOTOCIN  
DITINJAU DARI EKSPRESI IL-1 $\beta$  DAN  
HISTOPATOLOGI AORTA**

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

**ANANTA ARDI BAGASKARA**

**1351301071111015**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**

**LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**

**Pengaruh Pemberian Ekstrak Albedo Semangka Merah (*Citrullus vulgaris*) Sebagai Terapi Tikus (*Rattus norvegicus*)  
Model Diabetes Melitus Tipe I Yang Diinduksi  
Streptozotocin Ditinjau Dari Ekspresi  
IL-1 $\beta$  Dan Histopatologi Aorta**

Oleh:

**ANANTA ARDI BAGASKARA**

**NIM. 135130107111015**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
pada tanggal 8 Januari 2018  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

**Dr. Dra. Med.Vet. Herawati, MP.**      **drh. Fajar Shodiq Permata, M. Biotech**

NIP. 19580127 198503 2 001

NIP. 19870501 201504 1 001

Mengetahui,

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Brawijaya

**Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES.**

NIP. 19600903 198802 2 001

## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ananta Ardi Bagaskara

NIM : 135130107111015

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulisan Skripsi berjudul:

Pengaruh Pemberian Ekstrak Albedo Semangka Merah (*Citrullus vulgaris*) Sebagai Terapi Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Diabetes Melitus Tipe I Yang Diinduksi Streptozotocin Ditinjau Dari Ekspresi IL-1 $\beta$  Dan Histopatologi Aorta

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 8 Januari 2018

Yang menyatakan,

(Ananta Ardi Bagaskara)

NIM. 135130107111015

**Pengaruh Pemberian Ekstrak Albedo Semangka Merah (*Citrullus vulgaris*) Sebagai Terapi Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Diabetes Melitus Tipe I Yang Diinduksi Streptozotocin Ditinjau Dari Ekspresi IL-1 $\beta$  Dan Histopatologi Aorta**

**ABSTRAK**

*Diabetes Mellitus* (DM) tipe 1 merupakan tipe penyakit yang ditandai dengan kerusakan sel beta pankreas yang akan menyebabkan terjadinya defisiensi insulin. Kekurangan insulin berperan besar dalam mengakibatkan kondisi stres oksidatif yang mampu merusak sel endotel pada aorta sehingga menimbulkan inflamasi yang ditandai dengan ekspresi IL-1 $\beta$  sebagai sitokin proinflamasi. Upaya menurunkan tingkat stres oksidatif dalam tubuh salah satunya adalah dengan pemberian antioksidan seperti sitrulin, diketahui albedo semangka merah mempunyai kadar sitrulin tinggi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak albedo semangka merah sebagai terapi DM tipe 1 yang diinduksi streptozotocin ditinjau dari ekspresi IL-1 $\beta$  dan histopatologi aorta. Penelitian ini menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar jantan berumur 8-12 minggu yang dibagi dalam 5 kelompok perlakuan masing-masing 4 ekor yaitu: Kelompok negatif (K-), kelompok positif (K+), kelompok perlakuan (P1), (P2), dan (P3) yaitu tikus DM 1 dan diterapi dengan ekstrak albedo semangka masing-masing dosis 500mg/kgBB, 1000mg/kgBB, dan 1500mg/kgBB, ekspresi IL-1 $\beta$  diamati menggunakan metode IHK kemudian dianalisa secara kuantitatif dengan ANOVA satu arah dan dilanjut uji Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). Data kualitatif yang digunakan yaitu gambaran histopatologi aorta menggunakan pewarnaan HE. Hasil penelitian menunjukkan dengan dosis 1500 mg/KgBB terjadi penurunan ekspresi IL-1 $\beta$  sebesar 75,5% dan pengurangan kerusakan pada aorta. Kesimpulan penelitian ini yaitu ekstrak albedo semangka merah dapat digunakan sebagai terapi DM tipe 1 ditinjau dari penurunan ekspresi IL-1 $\beta$  dan histopatologi aorta.

**Kata kunci:** *Diabetes mellitus* tipe 1, albedo semangka merah, *Rattus norvegicus*, IL-1 $\beta$ , Histopatologi Aorta.

**EFFECT OF RED WATERMELON (*Citrullus vulgaris*) ALBEDO  
EXTRACT AS THERAPY OF THE WHITE RAT (*Rattus  
norvegicus*) DIABETES MELLITUS TYPE 1 MODELS  
INDUCED BY STREPTOZOTOCIN BASED ON  
EXPRESSION IL-1 $\beta$  AND AORTIC  
HISTOPATHOLOGY**

**ABSTRACT**

*Diabetes Mellitus* (DM) type 1 is a severe type of disease with pancreatic beta cell damage that will lead to insulin deficiency. Insulin deficiency plays a major role in causing oxidative stress conditions capable of damaging endothelial cells in the aorta resulting that causing inflammation characterized by IL-1 $\beta$  expression as proinflammatory cytokines. One of the efforts to reduce the level of oxidative stress in the body is by giving antioxidants such as sitrulin, known albedo red watermelon has high levels of sitrulin. The aim of this study was to determine the effect of red watermelon albedo extract as a streptozotocin-induced DM type 1 treatment based on IL-1 $\beta$  expression and aortic histopathology. This study used 8-12 weeks-old male white rats (*Rattus norvegicus*) strain of wistar and then divided into 5 groups, each group consisted of 4 white rats, group didivide into: negative group (K-), positive group (K +), treatment group (P1), (P2), and (P3) were DM1 rats and treated with red watermelon albedo extract at doses of 500mg kgBW, 1000mg/kgBW, and 1500mg/kgB, IL-1 $\beta$  expression were observed using IHK method, and data were analyzed quantitatively using one way ANOVA and continued with Tukey test ( $\alpha = 0,05$ ). Qualitative data were achieved from aortic histopathologic picture using HE staining. The results showed that the optimal dose of 1500 mg/KgBB decreased the expression of IL-1 $\beta$  by 75.5% and the reduction of aorta injury. The conclusion in this study is red watermelon albedo extract can be used as therapy of DM type 1 based on reduction of expression of IL-1 $\beta$  and aortic histopathology improvement.

**Keywords:** *Diabetes mellitus* type 1, Red Watermelon Albedo, *Rattus norvegicus*, IL-1 $\beta$ , Aortic Histopathology.



## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur saya panjatkan kepada Tuhan yang Maha Esa atas berkat dan anugerah-Nya penulis dapat menyelesaikan penelitian dengan judul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Albedo Semangka Merah (*Citrullus vulgaris*) Sebagai Terapi Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Diabetes Melitus Tipe I Yang Diinduksi Streptozotocin Ditinjau Dari Ekspresi IL-1 $\beta$  Dan Histopatologi Aorta” sebagai tugas akhir/skripsi sebagai syarat kelulusan menjadi Sarjana Kedokteran Hewan.

Skripsi ini disusun berdasarkan diskusi dengan berbagai pihak serta literatur yang penulis baca dari beberapa referensi. Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada :

1. Dr. Dra. Med.Vet. Herawati, MP selaku dosen pembimbing satu yang telah menyisihkan waktunya untuk membimbing penulis, serta memberikan semangat untuk menyempurnakan penulisan skripsi ini.
2. drh. Fajar Shodiq Permata, M.Biotech selaku dosen pembimbing dua yang telah menyisihkan waktunya untuk membimbing penulis pada saat penulisan skripsi ini.
3. drh. Yudit Oktanella, M.Si selaku dosen penguji satu atas segala ilmu, dukungan, serta saran dan masukan dalam penyempurnaan penulisan skripsi ini
4. drh. Wawid Purwatiningsih, M.Vet selaku dosen penguji atas segala ilmu, dukungan, serta saran dan masukan dalam penyempurnaan penulisan tugas skripsi ini.
5. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
6. Keluarga tercinta, ayahanda Takril Budi Ratno, ibunda Vivi Desiana, dan adik saya Zhafirah Afkarina Salsabila yang selalu memberi kasih sayang, dorongan, dukungan dan doa untuk menyelesaikan studi penulis serta perhatiannya akan kebutuhan penulis baik secara moril maupun materi.
7. Rekan seperjuangan grup AMD dan Sahabat-sahabat tercinta untuk waktu dan inspirasi yang diberikan pada penulis.

8. Seluruh dosen dan civitas akademika yang telah membimbing, memberikan ilmu, dan mewadahi penulis selama menjalankan studi di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
9. Dini Syarifah yang telah memberikan semangat dan doa untuk penulis.

Penulis sadar bahwa proposal ini masih jauh dari sempurna. Penulis berharap proposal ini dapat bermanfaat khususnya bagi penulis dan umumnya bagi pembaca untuk itu saran yang membangun sangat penulis harapkan.

Penulis





## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN.....</b>	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN.....</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>iv</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>vi</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>viii</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR BAGAN.....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN.....</b>	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG.....</b>	<b>xiv</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
1.3 Batasan Masalah.....	4
1.4 Tujuan Penelitian .....	5
1.5 Manfaat Penelitian .....	6
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>7</b>
2.1 Semangka Merah ( <i>Citrullus vulgaris</i> ) .....	7
2.2 Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ).....	9
2.3 Diabetes Mellitus .....	10
2.4 Mekanisme Streptozotocin sebagai Induksi Diabetes Mellitus .....	12
2.5 Pengaruh Diabetes Mellitus Terhadap Stress Oksidatif Tubuh .....	14
2.6 Interleukin 1 $\beta$ .....	15
2.7 Histologi Aorta.....	16
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN .....</b>	<b>17</b>
3.1 Kerangka Konseptual .....	17
3.2 Hipotesis Penelitian.....	19

<b>BAB 4 METODE PENELITIAN .....</b>	<b>21</b>
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....	21
4.2 Alat dan Bahan .....	21
4.3 Tahapan Penelitian .....	23
4.4 Prosedur Kerja .....	23
4.5 Analisa Data .....	31
<b>BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>32</b>
5.1 Kadar Glukosa Darah Pasca Induksi Streptozotocin .....	32
5.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak Albedo Semangka Merah ( <i>Citrullus vulgaris</i> ) Terhadap Ekspresi IL-1 $\beta$ pada Aorta Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) Model Diabetes Mellitus yang Diinduksi Streptozotocin .....	33
5.3 Pengaruh Pemberian Ekstrak Albedo Semangka Merah ( <i>Citrullus vulgaris</i> ) Terhadap Gambaran Histopatologi Aorta Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) Model Diabetes Mellitus yang Diinduksi Streptozotocin .....	38
<b>BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>44</b>
6.1 Kesimpulan .....	44
6.2 Saran .....	44
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>45</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>49</b>

**DAFTAR TABEL**

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
2.1 Kandungan gizi buah semangka per 100 gram bahan .....	8
4.1 Pembagian Kelompok Penelitian .....	24
5.1 Rata-rata kadar glukosa darah tiap kelompok perlakuan, hari ke 7 pasca induksi STZ .....	33
5.2 Data Perhitungan Area Ekspresi IL-1 $\beta$ pada Aorta .....	37



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Albedo Semangka .....	8
2.2 Tikus Putih Galur Wistar .....	10
2.3 Histologi Aorta Perbesaran 10x Pewarnaan HE .....	16
2.4 Erosi endotel pada Tunika Intima Aorta .....	16
5.1 Ekpresi IL-1 $\beta$ organ aorta pada masing-masing kelompok perlakuan perbesaran 400x.....	35
5.2 Histopatologi Aorta dengan Pewarnaan Hematoksilin Eosin(HE) perbesaran 400x.....	40



## DAFTAR BAGAN

Bagan	Halaman
3.1 Kerangka Konsep Penelitian.....	18



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema penelitian .....	49
2. Sertifikat Laik Etik .....	50
3. Dosis streptozotocin (STZ) .....	51
4. Pembuatan ekstrak albedo semangka merah ( <i>Citrullus vulgaris</i> ).....	56
5. Surat Keterangan Ekstrak Tanaman Semangka Merah ( <i>Citrullus vulgaris</i> ).....	57
6. Surat Keterangan Determinasi Tanaman Semangka Merah ( <i>Citrullus vulgaris</i> ).....	58
7. Perhitungan Dosis Terapi Ekstrak Albedo Semangka Merah ( <i>Citrullus vulgaris</i> ) .....	59
8. Pembuatan Preparat Histopatologi Aorta dengan Pewarnaan HE...	62
9. Pewarnaan Ekspresi IL-1 $\beta$ dengan pewarnaan immunohistokimia..	63
10. Hasil pemeriksaan kadar gula darah.....	65
11. Analisis Statistik <i>One Way</i> ANOVA Ekspresi Interleukin-1 $\beta$ .....	67



## DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

<u>Simbol/singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
AP-1	<i>Activator protein-1</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
IDDM	<i>Insulin dependent diabetes mellitus</i>
HE	<i>haematoxylin and eosin</i>
ICAM-1	<i>Inter Cellular Adhesion Molecule-1</i>
IL-1	<i>Interleukin-1</i>
IL-1 $\beta$	<i>Interleukin-1beta</i>
LDL	<i>low-density lipoprotein</i>
LCAT	<i>Lecithin Cholesterol Acyl Transferase</i>
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
ml	<i>Mililiter</i>
NADPH	<i>nicotinamide adenin dinucleotide phosphat hydrolase</i>
NF-kB	<i>Nuklear Factor Kappa Beta</i>
STZ	<i>Streptozotocin</i>
PBS	<i>phosphat buffered saline</i>
pH	<i>Potential of hydrogen</i>
RAL	<i>Rancangan Acak Lengkap</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
VCAM-1	<i>Vascullar Cell Adhesion Molecule-1</i>
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>
GLUT-2	<i>Glucose Transporter 2</i>
GLUT-4	<i>Glucose Transporter 4</i>
BNJ	<i>Beda Nyata Jujur</i>
SA-HRP	<i>Strep Avidin-Horseradish Peroxidase</i>
DAB	<i>Diaminobenzedine tetrahydrochloride</i>
G6P	<i>Glukosa 6 fosfat</i>
NO	<i>Nitrit Oksida</i>
IP	<i>Intraperitoneal</i>
IV	<i>Intravena</i>
SD	<i>Single dose</i>
MLD	<i>Multiple low dose</i>
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
cGMP	<i>Cyclic Guanosine Monophosphate</i>
DMB	<i>Diaminobenzidin</i>
Mg	<i>Milligram</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>

## RIWAYAT HIDUP



Nama : Ananta Ardi Bagaskara  
Tempat, Tanggal Lahir: Jember, 21 Oktober 1996  
Alamat : Jln.Citra Pahlawan no 101,  
Desa Keting, Jember.  
Jenis Kelamin : Laki-Laki  
Agama : Islam  
Riwayat Pendidikan : SDN 1 Keting  
SMPN 1 Lumajang  
SMAN 2 Lumajang  
Nomor Telepon : (0336)6414332  
Email : bagas21@rocketmail.com



## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Diabetes Melitus (DM) merupakan penyakit gangguan sistem endokrin yang ditandai dengan keadaan hiperglikemia atau peningkatan kadar glukosa dalam darah. Selain pada manusia, diabetes melitus juga dapat menyerang hewan. *The Banfield Hospital* (2016) menyatakan terjadi peningkatan kasus diabetes mellitus pada anjing sebanyak 79,7 % dari tahun 2006 hingga 2015. Diabetes melitus umumnya menyerang anjing pada umur antara 5 hingga 12 tahun. Jenis anjing seperti Samoyed, Tibtan Terrier dan Caim Terrier merupakan anjing yang umumnya menderita diabetes melitus (Catchpole *et al.*, 2005). ada dua jenis DM yang paling umum terjadi yaitu, DM Tipe I dan DM tipe II, DM tipe I diakibatkan oleh penurunan produksi insulin, DM tipe II keadaan resistensi reseptor sel terhadap insulin dan berkurangnya secara relatif kemampuan sel beta Langerhans dalam menghasilkan insulin (Rand *et al*, 2004).

Efek insulin pada metabolisme lipoprotein adalah insulin dapat menghambat kerja lipase di jaringan adiposa, sehingga jumlah asam lemak bebas sebagai substrat produksi *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL) yang masuk ke hati menurun, insulin menghambat produksi VLDL, insulin akan mempercepat *clearance* LDL dengan meningkatkan ekspresi dan aktifitas reseptor LDL, insulin membantu metabolisme *High Density Lipoprotein* (HDL) dengan meningkatkan aktifitas enzim *Lecithin Cholesterol Acyl Transferase* (LCAT), insulin membantu metabolisme HDL dengan

meningkatkan aktifitas lipase hati (Verges, 2009)

Penurunan sekresi insulin akan mengakibatkan penurunan ikatan antara insulin dengan reseptor  $\alpha$  dan  $\beta$  di sel target. Sehingga efek insulin pada sel target untuk proses translokasi protein, aktivitas enzim dan transkripsi gen menurun. Jika terjadi penurunan aktivitas insulin, maka efek insulin dalam metabolisme lipid pada jaringan adiposa terganggu. Akibatnya terjadi abnormalitas lipid dalam plasma, yakni peningkatan trigliserida dan kolesterol *low density lipoprotein* (LDL) (Goldberg, 2001).

Selain itu untuk memenuhi kebutuhan energi dalam kondisi diabetes mellitus terjadi proses glukoneogenesis yaitu proses sintesis glukosa dari sumber non-karbohidrat semisal lemak, semakin banyak lemak yang dimetabolisme juga akan menghasilkan ROS (Reactive Oxygen Species) sehingga terjadi keadaan stres oksidatif. Stres oksidatif dapat menyebabkan disfungsi endotel dengan menurunkan bioavailabilitas NO dengan cara berikatan langsung dengan NO melalui superoksida yang akan membentuk peroksinitrit (ONOO). Disfungsi endotel ditandai oleh gangguan keseimbangan vasodilatasi dan vasokonstriksi pembuluh darah, dan perubahan sifat endotel menjadi proinflamasi. Stres oksidatif memicu faktor transkripsi *nuclear factor*  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) dan activator protein 1 (AP-1) yang akan makin memperparah keadaan endotel. Faktor transkripsi NF- $\kappa$ B dan AP-1 merupakan gen-gen bersifat proinflamasi. Keduanya bertanggung jawab terhadap ekspresi molekul adhesi seperti *vascular cellular molecules* (VCAM-1), *Intra cellular adhesion molecules* (ICAM-1), E-selectin dan

sitokin lain tak kerkecuali ekspresi IL-1 $\beta$ . Munculnya beragam sitokin proinflamasi juga dapat dikarenakan masuknya LDL-ox kedalam sel. LDL-ox ini kemudian akan dikenali oleh *macrophag scavenge receptor* dan terjadi makropinositosis (Nurtamin, 2014).

Hingga saat ini kasus diabetes melitus tipe I tidak dapat diobati karena adanya kerusakan pada sel penghasil insulin di pankreas yaitu sel beta pankreas pada Pulau Langerhans namun hanya dapat dihambat proses keparahannya. Selama ini terapi terhadap diabetes melitus relatif cukup mahal, oleh karena itu mulai dikembangkan berbagai macam pengobatan alternatif dari bahan herbal. Terapi herbal relatif menimbulkan efek samping yang kecil dibandingkan dengan pengobatan kimia. Hal ini kemungkinan disebabkan karena tanaman obat bersifat kompleks dan organis yang cocok untuk tubuh sehingga tanaman obat yang dikonsumsi dapat digunakan untuk merekonstruksi organ atau sistem yang rusak (Ocktarini, 2010).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Sugiyanta (2011), albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) mengandung sitrulin yang mencapai 60% atau 24,4 mg/g berat kering. Sitrulin adalah asam amino nonesensial dengan ikatan karbon asimetris yang berperan penting dalam metabolisme dan regulasi NO (*Nitrogen Oxide*). Sitrulin memicu pembentukan arginin yang mampu meningkatkan jumlah NO endothelial yang secara langsung berperan dalam transport membrane (pompa  $Na^+$  dan  $K^+$ ). Ekstrak albedo semangka merah juga mengandung banyak antioksidan yang dapat mengoksidasi LDL-ox sehingga kadar LDL-ox dalam pembuluh darah

turun. Dari urain tersebut peneliti ingin mengetahui dampak pemberian ekstrak albedo semangka merah sebagai terapi diabetes melitus tipe I ditinjau dari ekspresi imunohistokimia IL-1 $\beta$  dan gambaran histopatologi aorta

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan masalah sebagai berikut :

1. Apakah pemberian ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) dapat menurunkan ekspresi IL-1 $\beta$  pada aorta tikus putih (*Rattus norvegicus*) model diabetes melitus tipe I yang diinduksi streptozotocin?
2. Apakah pemberian ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) dapat menghambat kerusakan aorta pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) model diabetes melitus tipe I yang diinduksi streptozotocin?

## 1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka penelitian ini dibatasi pada :

1. Hewan model tikus yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar berumur 8-12 minggu dengan bobot badan antara 100-150 g yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi FK UB, penggunaan hewan model dalam penelitian ini mendapatkan laik etik (No:781-KEP-UB) dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya.



2. *Streptozotocin* (STZ) yang digunakan adalah STZ yang didapatkan dari *Nacalai Tesque, INC.* (no katalog 32238-91) dan diinduksikan secara *intra peritoneal* dengan dosis 20 mg/kg BB selama 5 hari berturut-turut. Tikus dinyatakan diabetes apabila memiliki kadar glukosa darah lebih dari 300 mg/dl (Aulani'am dkk., 2005).
3. Albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) diperoleh dari hasil pertanian semangka rakyat di Desa Beji, Batu yang merupakan pusat agrobisnis pertanian di daerah Malang dan Batu.
4. Ekstraksi albedo semangka merah dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol. Dosis ekstrak albedo semangka yang diberikan sebagai terapi yaitu, 500 mg/kg BB, 1000 mg/kg BB dan 1500 mg/kg BB selama 14 hari secara *per-oral*, mulai dari hari ke 25 sampai dengan hari ke 38 perlakuan penelitian.
5. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah ekspresi IL-1 $\beta$  pada organ aorta dengan pewarnaan imunohistokimia dan gambaran histopatologi aorta.

#### 1.4 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui ekspresi imunohistokimia IL-1 $\beta$  pada aorta tikus putih (*Rattus norvegicus*) model DM tipe 1 hasil induksi *Streptozotocin* setelah pemberian terapi ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*).
2. Mengetahui gambaran histopatologi pada aorta tikus putih (*Rattus norvegicus*) DM tipe 1 hasil induksi *Streptozotocin* setelah di beri terapi albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*)

### 1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diperoleh dari penelitian adalah dapat memberikan informasi mengenai pengaruh pemberian ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) terhadap ekspresi imunohistokimia IL-1 $\beta$  dan gambaran histopatologi aorta tikus putih (*Rattus norvegicus*) model DM tipe 1 hasil induksi *Streptozotocin* .



## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Semangka Merah (*Citrullus vulgaris*)

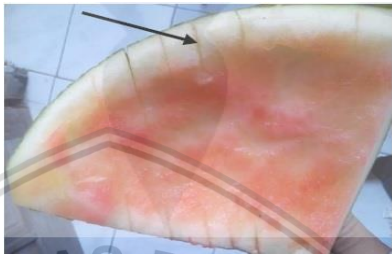
Semangka merah (*Citrullus vulgaris*) merupakan tanaman buah yang tumbuh merambat. Tanaman semangka berasal dari Afrika, kemudian berkembang dengan pesat ke berbagai negara baik di daerah tropis maupun subtropis. Batang tanaman ditumbuhi bulu-bulu halus yang panjang, tajam dan berwarna putih, mempunyai sulur yang bercabang 2-3 buah. Buahnya berbentuk bulat sampai bulat telur (oval). Kulit buahnya berwarna hijau atau kuning, blurik putih atau hijau. Daging buahnya lunak, berair, dan rasanya manis, dengan warna daging buah merah (Syukur *et al*, 2013).

Menurut Sobir dan Siregar (2010), kedudukan semangka dalam taksonomi tumbuhan secara lengkap adalah sebagai berikut:

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Cucurbitales
Famili	: Cucurbitaceae
Genus	: Citrullus
Spesies	: <i>Citrullus vulgaris</i>

Semangka memiliki beberapa bagian mulai dari lapisan terluar berupa kulit, lapisan tengah, dan daging buah semangka (Nur *et al*, 2016). Semangka merah (*Citrullus vulgaris*) merupakan buah yang memiliki kulit tebal dan berdaging, licin, warna kulit; hijau tua, kuning agak putih, atau

hijau muda bergaris-garis putih (Sugiyanta, 2011). Lapisan yang berwarna putih yakni antara kulit dan daging buah semangka yang berwarna disebut albedo dapat dilihat pada (**Gambar 2.1**), Beberapa kandungan dalam buah semangka merah dapat dilihat pada (**Tabel 2.1**).



**Gambar 2.1** Kulit Semangka yang telah dibersihkan, tanda (→) menunjukkan Albedo semangka (Puspitasari, 2014)

**Tabel 2.1** Kandungan gizi buah semangka per 100 gram bahan.

Komposisi	Jumlah
Energi	30 kkal
Lemak	0,15 gr
Lemak jenuh	0,016 gr
Lemak tak jenuh tunggal	0,037 gr
Kolesterol	0 mg
Protein	0,61 g
Karbohidrat	7,55 g
Serat	0,4 g
Gula	6,2 g
Sodium	1 mg
Kalium	112 mg
Lemak tak jenuh ganda	0,05 g

(Ardinata, 2015)

Kualitas gizi semangka menunjukkan bahwa sangat kaya akan vitamin A 3%, yang berbeda vitamin dari vitamin B kompleks seperti Tiamin (Vit. B1), Riboflavin (Vit. B2), Niacin (Vit. B3), pantotenat acid (B5), vitamin B6 dan folat (Vit. B9) yang berkisar antara 1-3%, Vitamin C 14%. Mineral Komposisi adalah Calcium 1%, Besi 2%, Magnesium 3%, Fosfor 2%,

Kalium 2% dan Zinc 1%. Selain itu juga mengandung asam lemak tak jenuh tinggi dan minyak. Selain beberapa kandungan tersebut di dalam buah semangka juga terdapat sitrulin. (Deshmukh *et al*, 2015)

Sitrulin ini ditemukan pada semua jenis buah semangka. Sitrulin akan bereaksi dengan enzim tubuh ketika dikonsumsi, lalu diubah menjadi arginin yang merupakan asam amino non esensial yang berkhasiat bagi jantung, sistem peredaran darah dan kekebalan tubuh. Kandungan kulit semangka lainnya yang bermanfaat bagi kesehatan yaitu vitamin, mineral, enzim, dan klorofil (Guoyao, *et.al.*, 2007).

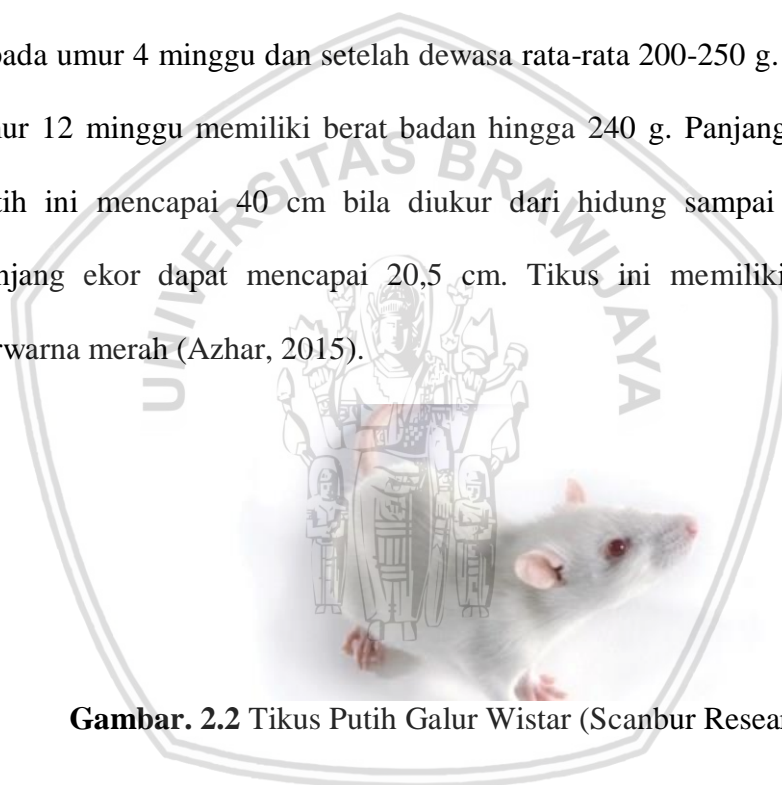
## 2.2 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

*Rattus norvegicus* memiliki rambut tubuh berwarna putih dan mata yang merah, panjang tubuh total 440 mm, panjang ekor 205 mm, memiliki berat badan dewasa berkisar 450-520 gram pada jantan dan 250-300 gram pada betina. Masa sapih tikus hingga umur 21 hari dan memasuki masa dewasa pada umur 40-60 hari (Smith dan Mangkoewidjojo, 1998).

Menurut Akbar (2010) taksonomi tikus putih (*Rattus norvegicus*) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodensia
Famili	: Muridae
Genus	: Rattus
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>

Kelebihan dari tikus putih (*Rattus norvegicus*) sebagai binatang percobaan antara lain bersifat omnivora (pemakan segala), Selain itu dari segi ekonomi memiliki harga yang murah dan berkembang dengan cepat. Tikus putih tergolong sebagai hewan nocturnal yang termasuk cerdas dan tahan terhadap infeksi (Azhar, 2015). Tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar dapat dilihat pada **Gambar 2.2** memiliki berat badan mencapai 35-40 g pada umur 4 minggu dan setelah dewasa rata-rata 200-250 g. Tikus jantan umur 12 minggu memiliki berat badan hingga 240 g. Panjang tubuh tikus putih ini mencapai 40 cm bila diukur dari hidung sampai ujung ekor. Panjang ekor dapat mencapai 20,5 cm. Tikus ini memiliki mata yang berwarna merah (Azhar, 2015).



**Gambar. 2.2** Tikus Putih Galur Wistar (Scanbur Research. 2010)

### 2.3 Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus merupakan kelainan metabolik berupa kondisi hiperglikemia kronis karena adanya kelainan sekresi insulin, kerja insulin, atau perpaduan keduanya. Efek yang ditimbulkan dari diabetes mellitus antara lain disfungsi dan kegagalan kerja dari beberapa organ (World Health Organization, 1999). Diabetes mellitus merupakan faktor risiko utama untuk pengembangan komplikasi penyakit kardiovaskular, Penyakit kini



menyumbang 80% dari semua kematian penderita diabetes (World Health Organization, 2004).

Secara normal menurut Merentek (2006) Sekresi insulin oleh sel beta tergantung oleh 3 faktor utama yaitu, kadar glukosa darah, *ATP-sensitive K channels* dan *Voltage-sensitive Calcium Channels* sel beta pankreas. Mekanisme kerja ketiga faktor ini sebagai berikut : Pada keadaan puasa saat kadar glukosa darah turun, *ATP sensitive K channels* di membran sel beta akan terbuka sehingga ion kalium akan meninggalkan sel beta (*K-efflux*), dengan demikian mempertahankan potensial membran dalam keadaan hiperpolar sehingga *Ca-channels* tertutup, akibatnya kalsium tidak dapat masuk ke dalam sel beta sehingga perangsangan sel beta untuk mensekresi insulin menurun. Sebaliknya pada keadaan setelah makan, kadar glukosa darah yang meningkat akan ditangkap oleh sel beta melalui *glucose transporter 2* (GLUT2) dan dibawa ke dalam sel. Di dalam sel, glukosa akan mengalami fosforilase menjadi glukosa-6 fosfat (G6P) dengan bantuan enzim penting, yaitu glukokinase. Glukosa 6 fosfat kemudian akan mengalami glikolisis dan akhirnya akan menjadi asam piruvat. Dalam proses glikolisis ini akan dihasilkan 6-8 ATP. Penambahan ATP akan meningkatkan rasio ATP/ADP dan ini akan menutup terowongan kalium. Dengan demikian kalium akan tertumpuk dalam sel dan terjadilah depolarisasi membran sel, sehingga membuka terowongan kalsium dan kalsium akan masuk ke dalam sel. Dengan meningkatnya kalsium intrasel akan terjadi translokasi granul insulin ke membrane dan insulin akan di-

lepaskan ke dalam darah akan terjadi translokasi granul insulin ke membrane dan insulin akan di-lepaskan ke dalam darah.

Pada kondisi diabetes mellitus, insulin tidak dapat diproduksi atau terjadi resistensi terhadap insulin. Sehingga kadar glukosa dalam darah tinggi. Menurut Nugroho (2006) Diabetes mellitus dibagi menjadi dua yaitu DM 1 dan DM 2, Diabetes mellitus tipe 1 disebabkan oleh gangguan terhadap sel beta Langerhans pankreas, sehingga produksi insulin sangat sedikit. Kemudian diabetes mellitus tipe 2, biasa disebabkan karena resistensi insulin pada permukaan sel. Hiperglikemia dan penurunan berat badan merupakan gejala spesifik dari DM tipe 1. Di samping itu, pada kondisi DM tipe 1 juga ditemukan gejala klinis seperti poliuria, polidipsia, dan polifagia. Hiperglikemia disebabkan oleh menurunnya sekresi insulin sehingga meningkatnya glukosa yang beredar dalam darah.

Diabetes mellitus yang tergantung insulin (IDDM = *insulin dependent diabetes mellitus*) atau tipe I diperantarai degenerasi sel  $\beta$  Langerhans pankreas akibat infeksi virus, pemberian senyawa toksin, diabetogenik (*streptozotocin*, *aloksan*), atau secara genetik (*wolfram syndrome*) yang mengakibatkan produksi insulin sangat rendah atau berhenti sama sekali. (Nugroho, 2006).

#### 2.4 Mekanisme Streptozotocin sebagai Induksi Diabetes Mellitus

*Streptozotocin* (STZ) adalah obat penginduksi diabetes permanen. *Streptozotocin* ini disintesis oleh mikroba *Streptomyces achromogenes*, (gram bakteri positif), STZ bersifat toxic bagi sel  $\beta$ -pankreas (Goud *et al*,

2015). Keuntungan penggunaan STZ pada induksi diabetes antara lain, kondisi diabetes karena induksi STZ lebih stabil jika dibandingkan bahan yang lain, serta model hewan coba yang dihasilkan dapat digunakan sebagai studi eksperimental dalam jangka waktu yang lama. (Hikmah, 2014)

*Streptozotocin* menembus sel beta langerhans melalui transporter glukosa *Glucose transporter-2* (GLUT-2) Deoxyribonucleic acid (DNA) sel beta pankreas berubah seiring dengan masuknya streptozotocin secara intraseluler. Didalam sel beta pankreas STZ akan melalui serangkaian proses metabolime, STZ merupakan donor NO, yang berakibat pada kerusakan sel melalui peningkatan aktivitas enzim guanilil siklase dan pembentukan cyclic Guanosine Monophosphate (cGMP). Selain itu, terjadi alkilasi DNA oleh streptozotocin melalui gugus nitrosourea pada sel pankreas. Selanjutnya, streptozotocin menginduksi oksigen reaktif yang berperan dalam kerusakan sel beta pankreas. melalui peningkatan aktivitas enzim xantin oksidase sehingga kadar anion superoksida tinggi. Streptozotocin dalam hal ini menghambat siklus krebs dan menurunkan konsumsi oksigen mitokondria, akibatnya produksi Adenosine Triphosphate (ATP) pada mitokondria berkurang dan mengakibatkan pengurangan secara drastis nukleotida sel beta pankreas (Nugroho, 2006).

Berbagai macam rute administrasi telah dilaporkan dalam menginduksi diabetes pada tikus dengan STZ. STZ paling sering digunakan dengan cara melalui dua rute, intraperitoneal (IP) atau intravena (IV). Pemberian IP menawarkan metode administrasi yang cepat dan mudah, terutama untuk

studi yang melibatkan beberapa dosis obat. Dua protokol yang paling umum dari pemberian dosis injeksi intraperitoneal yaitu single high dose Streptozotocin (SD –STZ) atau multiple low dose Streptozotocin (MLD-STZ). Protokol dosis rendah berulang biasanya melibatkan pemberian intraperitoneal dari 5 dosis harian berturut-turut dari 40 mg/kg streptozotocin (Goud *et al*, 2015).

Bila streptozotocin sudah merusak sel beta pankreas, maka pankreas tidak bisa menghasilkan insulin, kadar glukosa yang meningkat dapat menyebabkan gangguan metabolisme lainnya dan menghasilkan radikal bebas, radikal bebas akan merusak sel endotel dalam tubuh (Baqarizky, 2015).

## **2.5 Pengaruh Diabetes Mellitus Terhadap Stress Oksidatif Tubuh**

Stres oksidatif timbul akibat reaksi metabolik yang menggunakan oksigen dan mengakibatkan gangguan pada keseimbangan antara oksidan dan antioksidan sel (Suarsana *et al*, 2013). Jika produksi radikal bebas melebihi dari kemampuan antioksidan intrasel untuk menetralkannya maka kelebihan radikal bebas sangat potensial menyebabkan kerusakan sel. Sering kali kerusakan ini disebut sebagai kerusakan oksidatif, yaitu kerusakan biomolekul penyusun sel yang disebabkan oleh reaksinya dengan radikal bebas (Kevin *et al*. 2006).

Radikal bebas yang terbentuk dapat menimbulkan cedera endotel. Adanya disfungsi endotel memicu terbentuknya sitokin proinflamasi dan factor pertumbuhan sehingga terjadi proliferasi sel otot polos dan sintesis

matriks ekstraseluler dan tampak adanya penebalan pada tunika intima-media pada dinding arteri (Purwandhono dan Normasari, 2015).

## 2.6 Interleukin 1 $\beta$

*Interleukin 1 $\beta$*  (IL-1 $\beta$ ) merupakan sitokin pro-inflamasi yang diproduksi oleh berbagai sel monosit dan limfosit T, yang kemudian melepaskan sinyal inflamasi. Sitokin inflamasi ini memiliki aktivitas pro-koagulan yang menstimulir sel monosit melakukan adhesi ke endotel. Setelah melewati permukaan endotel, akan menyebabkan kerusakan endotel. Kerusakan ini menyebabkan sel endotel menghasilkan molekul sel adhesi, seperti halnya IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , kemokin (*monocyte chemoattractant factor 1*, *MPC-1*) dan *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF) (Eizirik and Mandrup-Poulsen, 2001).

IL-1 $\beta$  adalah sitokin multifungsi yang bertanggung jawab untuk aktivasi makrofag, angiogenesis, dan regulasi dari peradangan, ikatan dari IL-1 $\beta$  ke IL-1 reseptor 1 yang mengaktivasi jalur NF- $\kappa$ B, studi terbaru menunjukkan faktor transkripsi NF- $\kappa$ B memainkan peran kunci dalam respon inflamasi terhadap berbagai stimulus. Hal tersebut mengukuhkan IL-1 $\beta$  beraktivitas di sekitar sel endotel (lim *et al*, 2009).

## 2.7 Histologi Aorta

Aorta merupakan pembuluh dasar besar yang utama, disebut juga arteri elastis sebagai bagian dari sistem sirkulasi sistemik. Dinding aorta secara histologi terdiri atas tiga lapis berturut-turut dari dalam keluar yaitu tunika intima, tunika media dan tunika adventisia. Tunika intima terdiri dari selapis

sel endotel yang berfungsi mempertahankan integritas vascular dan dibawahnya terdapat lapisan sub endotel yang berfungsi mempertahankan integritas vascular dan dibawahnya terdapat lapisan sub endotel berupa jaringan ikat serabut elastis dan sel-sel otot polos yang tersusun konsentris. Tunika adventisia terdiri dari serabut elastis, kolagen dan dikelilingi oleh vasa vasorum (Guyton, 2001). Gambaran histologi aorta dapat dilihat pada (Gambar 2.3)

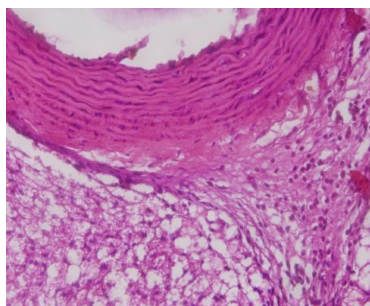


**Keterangan :**

- I = Tunika Intima
- M = Tunika Media
- A = Tunika Adventisia
- V = Vasa Vasorum

**Gambar 2.3** Histologi Aorta normal (Mescher, 2010).

Pada keadaan diabetes mellitus, karena adanya ketidakseimbangan metabolisme tubuh, dapat mengakibatkan adanya erosi pada sel endotel dibagian Tunika Intima (Rufaida, 2012). Gambaran kerusakan histotologi aorta dapat dilihat pada (Gambar 2.4).

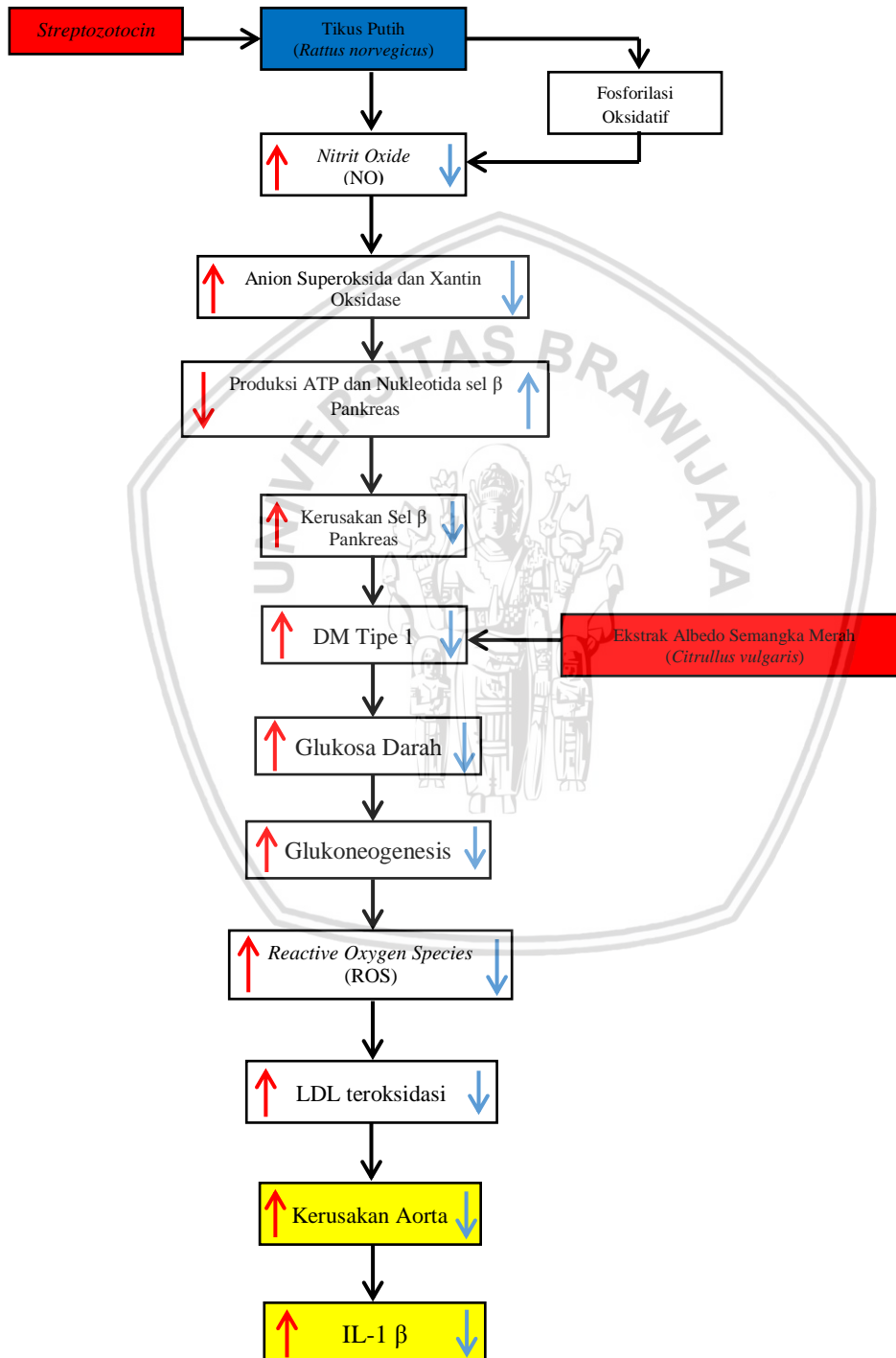


**Gambar 2.4** Erosi sel endotel pada tunika Intima Aorta ( Rufaida, 2012)



## BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

### 3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Kerangka Konseptual

Diabetes mellitus adalah penyakit gangguan endokrin yang ditandai dengan ketidakmampuan sel-sel tubuh untuk mempergunakan glukosa. Karakteristik utama dari penyakit ini yaitu peningkatan level glukosa, (hiperglikemia) yang disebabkan oleh karena menurunnya produksi insulin. Penurunan jumlah sekresi insulin ini disebabkan oleh kerusakan pada sel-sel  $\beta$  pulau Langerhans dalam kelenjar pankreas.

*Streptozotocin* (STZ) merupakan senyawa toksik yang selektif pada pulau langerhans pankreas. STZ diketahui dapat menyebabkan kematian secara spesifik sel  $\beta$  langerhans pankreas dan menginduksi DM (Salih *et.al.*, 2009). Dalam hal ini, STZ diinduksikan pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) *intra peritonal* (IP) dengan dosis 20 mg/kg BB selama 5 hari berturut-turut (*Multi Low Dose Streptozotocin*) (Aulanni'am *et al.*, 2005). STZ menembus sel pankreas melalui transpoter glukosa GLUT-2. STZ merupakan donor *nitric oxide* (NO) yang mempunyai kontribusi terhadap kerusakan sel  $\beta$  pankreas, STZ mampu membangkitkan oksigen reaktif (ROS) yang mempunyai peran tinggi dalam kerusakan sel  $\beta$  langerhans pankreas. Pembentukan anion superoksida karena aksi STZ dalam mitokondria dan peningkatan aktivitas xantin oksidase. Dalam hal ini, STZ menghambat siklus Krebs dan menurunkan konsumsi oksigen mitokondria. Produksi ATP mitokondria yang terbatas selanjutnya mengakibatkan pengurangan secara drastis nukleotida sel  $\beta$  langerhans pankreas. Penurunan produksi ATP dan nukleotida sel  $\beta$  langerhans pankreas berakibat pada kerusakan  $\beta$  langerhans pankreas yang secara otomatis menyebabkan

penurunan produksi insulin dan meningkatnya glukosa darah (Nugroho, 2006). Kondisi DM akibat induksi STZ akan menyebabkan kerusakan sel  $\beta$  langerhans yang berakibat pada menurunnya produksi insulin sehingga tubuh tidak mampu menyerap glukosa, akibatnya sumber energi didapatkan dari proses glukoneogenesis yang menyebabkan tingginya kadar LDL dalam darah, kondisi stress oksidatif dikarenakan pembentukan ROS berlebih akan menyebabkan LDL teroksidasi, akibatnya LDL tidak mampu dikenali oleh reseptor LDL, sehingga akan ditangkap oleh sel makrofag. Perubahan histopatologi pada aorta berupa adanya kerusakan endotel dan peningkatan jumlah mediator respon inflamatori yaitu IL-1 $\beta$ . Bagian kulit semangka merah (*Citrullus vulgaris*) yang berwarna putih atau biasa disebut dengan albedo selama ini hanya dianggap limbah dan dibuang memiliki potensi sebagai agen terapi untuk penyakit diabetes melitus. Kandungan utama albedo semangka (*Citrullus vulgaris*) adalah sitrullin yang mencapai 60% atau 24,4 mg/g berat kering. Sitrullin merupakan asam amino nonesensial dengan ikatan karbon asimetris yang berperan penting dalam metabolisme dan regulasi NO (*Nitric oxide*). Sitrullin memicu pembentukan arginin, arginin meningkatkan jumlah NO endotelial (Sugiyanta, 2011).

Sitrullin merupakan senyawa asam amino nonesensial yang bersifat antioksidan karena dapat dimanfaatkan oleh tubuh menjadi NO, NO dapat berperan sebagai antioksidan dengan menetralkan anion superoksida. Pemberian antioksidan terbukti dapat menangkap radikal bebas dan mengurangi stres oksidatif. Antioksidan dalam *Citrullus vulgaris* mampu

mengurangi komplikasi diabetes melitus melalui pengurangan stress oksidatif. Sebagai antioksidan, sitrullin yang terkandung dalam buah semangka dapat menghambat kerusakan aorta yang diakibatkan oleh DM tipe I pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang telah diinduksi dengan STZ, hal ini ditandai dengan pengurangan kerusakan endotel dan sitrulin memiliki efek untuk menghambat reaksi inflamasi jaringan sehingga sitokin proinflamatori seperti IL-1 $\beta$  tidak dilepaskan. Dalam penelitian ini, kandungan sitrulin dalam ekstrak albedo *Citrullus vulgaris* diharapkan mampu menurunkan kadar radikal bebas pada hewan coba DM tipe I, sehingga ekspresi imunohistokimia IL-1 $\beta$  dan menurunkan tingkat kerusakan histologi aorta yang ditandai dengan adanya erosi endotel dapat diturunkan dengan adanya antioksidan sitrullin ini.

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian berdasarkan rumusan masalah yaitu:

1. Pemberian ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) dapat menurunkan ekspresi imunohistokimia IL-1 $\beta$  pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) model diabetes melitus tipe I yang diinduksi *Streptozotocin*.
2. Pemberian ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) dapat menghambat kerusakan pada aorta tikus putih (*Rattus norvegicus*) model diabetes melitus tipe I yang diinduksi *Streptozotocin*.

## BAB 4 METODE PENELITIAN

### 4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada Bulan 1 mei – 13 juni 2017 di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk perlakuan dan pemeliharaan hewan coba, Laboratorium Materia Medika Batu untuk pembuatan ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*), Laboratorium Kessima Rumah Sakit Islam Aisyah Malang untuk pewarnaan HE dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk pembuatan preparat histopatologi aorta dengan pewarnaan imunohistokimia.

### 4.2 Alat dan Bahan

Alat yang diperlukan untuk persiapan hewan coba, yaitu ruangan, kandang pemeliharaan, sekam, tempat makan dan minum hewan percobaan serta alat pengukur suhu dan kelembaban lingkungan. Bahan yang digunakan yaitu, pakan dan air minum hewan percobaan, 20 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar berusia 8-12 minggu dengan berat badan 150 gram.

Alat yang diperlukan untuk membuat hewan model DM tipe I, yaitu *disposable syringe* 1 ml untuk injeksi *intra-peritoneal* dan *glucometer* untuk mengukur kadar glukosa tikus sebelum dan setelah perlakuan. Bahan yang digunakan adalah *streptozotocin* sebagai agen diabetogenik dengan dosis penggunaan 20 mg/kg BB.

Alat yang dibutuhkan untuk pembuatan, perhitungan dosis dan pembe-

rian ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*), yaitu alat pemotong, *blender*, timbangan analitik, erlenmeyer, *Beaker glass*, gelas ukur, corong gelas, botol, kertas saring, shaker digital, *alcoholmeter*, penangas air dan sonde lambung. Bahan yang digunakan yaitu, albedo atau daging kulit semangka merah (*Citrullus vulgaris*) yang berwarna putih, methanol dan akuades.

Alat yang dibutuhkan untuk isolasi organ aorta adalah scalpel, gunting, pinset dan pot spesimen. Bahan yang digunakan, yaitu NaCl fisiologis dan formalin 10%.

Alat yang dibutuhkan untuk membuat preparat histopatologi aorta dengan pewarnaan HE adalah, inkubator, wadah pewarnaan, alat pemotong jaringan, *object glass*, *cover slip*, penjepit mikrotom, dan mikroskop Olympus BX51. Bahan yang digunakan, yaitu formaldehid, etanol 70%, etanol 80%, etanol 90%, etanol 95%, etanol absolut, alkohol 95%, alkohol 90%, alkohol 80%, alkohol 70%, alkohol absolut, xylol I, xylol II, parafin, akuades, pewarna HE dan *etellan*.

Alat yang dibutuhkan untuk membuat preparat histopatologi aorta dengan pewarnaan imunohistokimia dan perhitungan ekspresi IL-1 $\beta$  aorta adalah, *object glass*, mikroskop Olympus BX51, mikropipet, *yellow tip*, sentrifugator, dan *cover slip*. Bahan yang digunakan yaitu, xylol, etanol absolut, alkohol 80%, alkohol 70%, akuades steril, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, PBS pH 7.4, BSA 1%, antibodi primer *rat Anti IL-1 $\beta$* , antibodi sekunder *Rabbit Anti rat IgG biotin labeled*, *Strep Avidin horse Radis peroxidase* (SA-HRP), Kromogen

(DAB), *Hematoxylin Eosin* (HE) dan *etellen*.

### 4.3 Tahapan Penelitian

1. Rancangan penelitian dan persiapan hewan coba
2. Pembuatan hewan model diabetes melitus tipe I (Induksi *streptozotocin*)
3. Pembuatan dan penghitungan dosis ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*)
4. Pemeriksaan kadar glukosa darah
5. Pemberian ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*)
6. Pengambilan dan isolasi organ aorta
7. Pembuatan dan pengamatan preparat histologi aorta dengan pewarnaan imunohistokimia
8. Pembuatan dan pengamatan preparat histologi aorta dengan pewarnaan *Hematosilin Eosin*
9. Perhitungan Ekspresi imunohistokimia IL-1 $\beta$  dan deskripsi kerusakan aorta

### 4.4 Prosedur Kerja

#### 4.4.1 Rancangan Penelitian dan Persiapan Hewan Coba

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan coba dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu kelompok kontrol positif, kelompok dosis ekstrak 1, kelompok dosis ekstrak 2, kelompok dosis ekstrak 3, dan kelompok kontrol negatif yang dibagi dalam kelompok (**Tabel 4.1**).



**Tabel 4.1** Pembagian Kelompok Penelitian

No.	Kelompok	Perlakuan
1	<b>K-</b>	<b>Kontrol negatif</b>
2	<b>K+</b>	<b>Kontrol positif</b>
3	<b>P1</b>	<b>Tikus DM Tipe I + terapi ekstrak albedo semangka merah dosis 500 mg/kg BB</b>
4	<b>P2</b>	<b>Tikus DM Tipe I + terapi ekstrak albedo semangka merah dosis 1000 mg/kg BB</b>
5	<b>P3</b>	<b>Tikus DM Tipe I + terapi ekstrak albedo semangka merah dosis 1500 mg/kg BB</b>

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

Variabel bebas : Dosis STZ, ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*)

Variabel tergantung : Ekspresi IL-1 $\beta$  dan histopatologi aorta

Variabel kendali : Tikus putih (*Rattus norvegicus*), kandang, pakan, umur, jenis kelamin dan berat badan.

Sampel penelitian menggunakan hewan coba berupa tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar berumur 8-12 minggu dengan berat badan rata-rata 200 gram. Hewan coba diaklimatisasi selama empat belas hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium. Perkiraan besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Montgomery dan Kowalsky, 2011) :

$p(n-1)$	$\geq 15$	
$5(n-1)$	$\geq 15$	Keterangan :
$5n - 5$	$\geq 15$	$p$ : jumlah kelompok hewan coba
$5n$	$\geq 20$	$n$ : jumlah ulangan yang diperlukan
$n$	$\geq 4$	

Berdasarkan perhitungan di atas maka untuk lima kelompok hewan coba diperlukan jumlah ulangan paling sedikit empat kali dalam setiap kelompok sehingga dibutuhkan 20 ekor hewan coba.

#### 4.4.2 Pembuatan Hewan Model Diabetes Melitus Tipe I (Aulanni'am *et al*, 2005)

Tikus putih jantan strain Wistar sejumlah 20 ekor dengan umur 8-12 minggu diukur kadar glukosa pasca aklimatisasi menggunakan glukometer pada semua kelompok perlakuan. Pemberian injeksi STZ pada kelompok K+, P1, P2, dan P3 dengan kelompok K- sebagai kontrol negatif. Dosis yang digunakan sebesar 20 mg/kg BB melalui intraperitoneal (IP) selama lima hari berturut-turut (*Multi Low Dose Streptozotocin*) dan diinkubasi selama 9 hari. Pada proses diabetes melitus, dilakukan pengukuran kadar glukosa setiap seminggu sekali untuk memastikan tikus telah mengalami kenaikan kadar glukosa. Kadar glukosa normal pada tikus sebesar  $\leq 126$  mg/dl. Kejadian diabetes melitus pada tikus ditandai dengan kadar glukosa  $> 300$  mg/dl (Hussain, 2002).

#### 4.4.3 Pembuatan dan Penentuan Dosis Ekstrak Albedo Semangka

##### Merah (*Citrullus vulgaris*)

Pembuatan ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) ini dengan menggunakan metode maserasi, Pembuatan ekstrak sitrulin dimulai dengan mencuci bersih albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) dan dipotong tipis-tipis, kemudian ditimbang sebanyak 2 kg. Dihaluskan menggunakan *blender* dengan ditambahkan pelarut metanol. Bahan yang telah dihaluskan dimasukkan ke dalam toples, diratakan dan ditambahkan pelarut metanol sampai terendam (pelarut yang digunakan minimal 2 kali berat bahan). Tutup toples dengan rapat selama 72 jam. Dishaker diatas shaker digital dengan kecepatan 50rpm. Ekstrak cair disaring dengan kertas saring dan ditampung dalam erlenmeyer. Hasil ekstrak cair kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* selama kurang lebih 1 jam 30 menit. Ekstrak yang dihasilkan diuapkan kembali di atas penangas air selama 2 jam.

Penentuan dosis efektif ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) merupakan hasil modifikasi dosis penelitian yang pernah diteliti oleh Sugiyanta (2011). Pada penelitian ini, dosis yang digunakan dibedakan menjadi 3, yaitu dosis 1 (500 mg/kg BB), dosis 2 (1000 mg/kg BB), dan dosis 3 (1500 mg/kg BB).

#### 4.4.4 Pengukuran Kadar Glukosa

Pemeriksaan kadar glukosa dilakukan setiap tujuh hari sekali.

Kadar glukosa diukur dengan menggunakan *glucotest* (strip glukometer dan glukometer *GlucoDr<sup>TM</sup>*). Darah didapatkan dari pembuluh darah pada bagian ujung ekor yaitu *vena coccygeal* hewan model yang sebelumnya dibersihkan dengan alkohol 70%, kemudian diurut secara perlahan, selanjutnya ujung ekor ditusuk dengan menggunakan jarum kecil (*syringe 1ml*). Darah yang keluar kemudian disentuhkan pada bagian strip glukometer. Kadar glukosa akan terbaca di layar *GlucoDr<sup>TM</sup>* dan dinyatakan dalam mg/dl.

#### 4.4.5 Pemberian Ekstrak *Citrullus vulgaris*

Pemberian ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) dilakukan selama 14 hari sesuai dengan dosis yang telah ditentukan, yaitu dosis 1 (500 mg/kg BB), dosis 2 (1000 mg/kg BB), dan dosis 3 (1500 mg/kg BB) dengan cara disondekan dimulai pada hari ke 30 hingga hari ke 43 perlakuan.

#### 4.4.6 Pembedahan dan Isolasi Organ Aorta

Sebelum dilakukan isolasi aorta, tikus dimatikan terlebih dahulu dengan dislokasi leher kemudian dilakukan pembedahan melalui linea alba. Kemudian mengeluarkan jantung dan isi abdomen. Aorta diambil dari thorak hingga abdomen lalu dicuci dengan NaCl fisiologis dan direndam dengan larutan *formalin* 10%.

#### 4.4.7 Pembuatan dan Pengamatan Preparat Histologi Aorta

Sampel organ aorta yang diambil dibuat preparat histologi. Proses pembuatan preparat histologi terdiri dari fiksasi, dehidrasi dan infiltrasi, penjernihan, infiltrasi parafin, *embedding*, *sectioning*, penempelan di *object glass*, dan pewarnaan (Jusuf, 2009).

Fiksasi dilakukan untuk mencegah kerusakan pada jaringan, menghentikan proses metabolisme, mengawetkan komponen sitologis dan histologis, serta mengeraskan materi yang lunak agar jaringan dapat diwarnai. Fiksasi dilakukan dengan cara dimasukkan ke dalam larutan formalin 10%.

Dehidrasi dilakukan menggunakan larutan etanol secara bertingkat dari konsentrasi 70% selama 24 jam, etanol 80% selama 2 jam serta etanol 90%, 95% dan absolut selama 20 menit. Proses dehidrasi berjalan dalam kondisi teragitasi dan pada suhu 4°C. Untuk melakukan penjernihan, jaringan dipindahkan dari alkohol absolut ke larutan penjernihan yaitu xylol I selama 20 menit dan xylol II selama 30 menit. Selanjutnya adalah proses infiltrasi dan *embedding* yang dilakukan dalam parafin cair yang ditempatkan dalam inkubator bersuhu 58-60°C. Jaringan dimasukkan dalam parafin cair sampai memadat. Setelah membeku, cetakan diletakkan dalam penjepit mikrotom dan dipotong dengan ketebalan  $\pm 5 \mu\text{m}$ . Jaringan dipotong untuk merapikan bagian yang tidak terpotong secara sempurna pada awal pemotongan. Sediaan disimpan dalam inkubator

dengan suhu 38-40°C selama 24 jam lalu siap diwarnai dengan hematoksin eosin (HE).

Pewarnaan HE dilakukan dengan menggunakan zat pewarna hematoksin untuk memberi warna pada inti sel dan memberikan warna biru (basofilik) serta eosin yang merupakan *counterstaining* hematoksin, digunakan untuk memulas sitoplasma sel dan jaringan penyambung sehingga memberikan warna merah muda. Diawali dengan proses deparafinasi dengan menggunakan xylol I dan II selama 5 menit lalu dilanjutkan dengan proses rehidrasi dengan menggunakan alkohol 95%, 90%, 80%, dan 70% secara berurutan masing-masing selama 5 menit. Sediaan dicuci dengan air mengalir selama 15 menit dan dilanjutkan dengan aquades selama 5 menit. Sediaan diwarnai dengan pewarna hematoksin selama 10 menit kemudian dicuci dengan air selama 30 menit dan aquades selama 5 menit. Setelah itu sediaan diwarnai dengan pewarna eosin selama 5 menit dan dicuci kembali dengan air mengalir selama 10 menit. Setelah terwarnai, sediaan didehidrasi dengan etanol 80%, 90%, dan 95% selama 5 menit. Langkah terakhir yaitu sediaan dikeringkan dan dilapisi (*mounting*) dengan menggunakan *entellan*.

Hasil pembuatan preparat histologi aorta diamati secara visual menggunakan mikroskop *Olympus BX51* dengan perbesaran lemah (100x) dilanjutkan perbesaran kuat (400x) untuk melihat gambaran aorta.

#### 4.4.8 Pembuatan dan Perhitungan Ekspresi IL-1 $\beta$

Pengamatan imunohistokimia bertujuan untuk menghitung jumlah ekspresi IL-1 $\beta$  pada aorta. Tahap awal imunohistokimia adalah deparafinasi, yaitu preparat direndam dalam larutan *xylol* I, *xylol* II, dan etanol absolut (2 x 5 menit), alkohol 90%, alkohol 80%, alkohol 70%, dan akuades steril masing-masing selama 5 menit. Kemudian dilakukan antigen retrieval dengan direndam buffer sitrat pH 6,0 dan dipanaskan dalam waterbath dengan suhu 95 °C selama 20 menit. Setelah itu dicuci dengan PBS (3 x 5 menit). Preparat dicuci dalam PBS pH 7,4 (3x5 menit) lalu direndam dalam 3% Hidrogen Peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) selama 10 menit (dalam PBS), dan dicuci kembali dalam PBS pH 7,4 (3x5 menit), lalu direndam dalam 1% BSA (dalam PBS) selama 1 jam pada suhu ruang. Preparat ditetesi dengan antibody primer *rat Anti IL-1 $\beta$*  (dalam BSA 1%) dalam PBS 1:100 dan diinkubasi pada suhu 4°C selama 24 jam. Preparat dikeluarkan dari *refrigerator* dan dibiarkan selama 30 menit dalam suhu ruang, lalu dicuci dengan PBS pH 7,4 (3x5 menit). Ditambahkan antibodi sekunder *Rabbit Anti rat IgG biotin labeled* dalam PBS (1:200) selama 1 jam pada suhu ruang, lalu dicuci dengan PBS pH 7,4 (3x5 menit). Ditambahkan SA-HRP dalam PBS (1:500) selama 40 menit pada suhu ruang, lalu dicuci dengan PBS pH 7,4 (3x5 menit). Kromogen DAB (3,3-*diaminobenzidine tetrahydrochloride*) ditambahkan selama 20 menit pada suhu ruang



lalu dicuci dengan PBS pH 7,4 (3x5 menit). *Counter stain* (*Hematoxylin Eosin*) 5 menit pada suhu ruang Dilakukan *mounting* dengan *etellen* kemudian ditutup dengan *cover glass* (Ramos-Vara, 2005).

Pewarnaan imunohistokimia bertujuan untuk menghitung presentasi ekspresi IL-1 $\beta$  pada aorta. Preparat jaringan aorta yang telah dilakukan pewarnaan selanjutnya diamati menggunakan mikroskop cahaya Olympus BX51 dengan perbesaran 400x. Pengamatan selanjutnya didokumentasikan pada lima lapang pandang. Hasil positif berupa bintik-bintik berwarna coklat, hal ini disebabkan karena hasil ikatan IL-1 $\beta$  sebagai antigen dengan antibodi sekunder berlabel. Selanjutnya penghitungan presentasi area ekspresi IL-1 $\beta$  dianalisa menggunakan *software Immunoratio*.

#### 4.5 Analisa Data

Analisa data yang digunakan dalam penelitian ini adalah berupa data kuantitatif dan kualitatif dimana data kuantitatif yaitu ekspresi IL-1 $\beta$  sedangkan data kualitatif yaitu perubahan histopatologi aorta berupa erosi sel endotel. Data kuantitatif IL-1 $\beta$  yang diperoleh dari hasil perlakuan ditabulasi dengan menggunakan *Microsoft Office Excel* dan dianalisis menggunakan SPSS 24.0 *for Windows* dengan analisa ragam *One-Way ANOVA*  $\alpha = 0,05$ . Apabila terdapat perbedaan nyata, uji dilanjutkan dengan pembandingan berganda uji *Tukey* atau Beda Nyata Jujur (BNJ).

## BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Kadar Glukosa Darah Pasca Induksi Streptozotocin

*Streptozotocin* (STZ) adalah obat penginduksi diabetes mellitus, STZ bersifat toxic bagi sel  $\beta$ -pankreas (Goud *et al*, 2015). *Streptozotocin* menembus sel beta langerhans melalui transporter glukosa *Glucose transporter-2* (GLUT-2) Deoxyribonucleic acid (DNA) sel beta pankreas berubah seiring dengan masuknya streptozotocin secara intraseluler. Didalam sel beta pankreas STZ akan melalui serangkaian proses metabolisme, Selain itu, terjadi alkilasi DNA oleh streptozotocin melalui gugus nitrosourea pada sel pankreas. Selanjutnya, streptozotocin menginduksi oksigen reaktif yang berperan dalam kerusakan sel beta pankreas. melalui peningkatan aktivitas enzim xantin oksidase sehingga kadar anion superoksida tinggi. Streptozotocin dalam hal ini menghambat siklus krebs dan menurunkan konsumsi oksigen mitokondria, akibatnya produksi Adenosine Triphosphate (ATP) pada mitokondria berkurang dan mengakibatkan pengurangan secara drastis nukleotida sel beta pankreas (Nugroho, 2006).

Keuntungan penggunaan STZ pada induksi diabetes antara lain, kondisi diabetes karena induksi STZ lebih stabil jika dibandingkan bahan yang lain, serta model hewan coba yang dihasilkan dapat digunakan sebagai studi eksperimental dalam jangka waktu yang lama. (Hikmah, 2014).

Dalam penelitian ini tikus putih yang digunakan mengalami peningkatan kadar glukosa darah dalam tubuh setelah induksi streptozotocin

yang ditunjukkan pada **Tabel 5.1**

**Tabel 5.1** Rata-rata kadar glukosa darah tiap kelompok perlakuan, hari ke 7 pasca induksi STZ

Kelompok	Kadar Gula Darah (mg/dl) (Mean $\pm$ SD)
K-	98 $\pm$ 11,01
K+	303 $\pm$ 10,96
P1	326 $\pm$ 117,02
P2	389 $\pm$ 83,61
P3	312 $\pm$ 32,64

Menurut hussain (2012) kejadian diabetes melitus pada tikus ditandai dengan kadar glukosa  $>300$  mg/dl, kemudian tikus diberikan terapi ekstrak albedo semangka merah selama 14 hari.

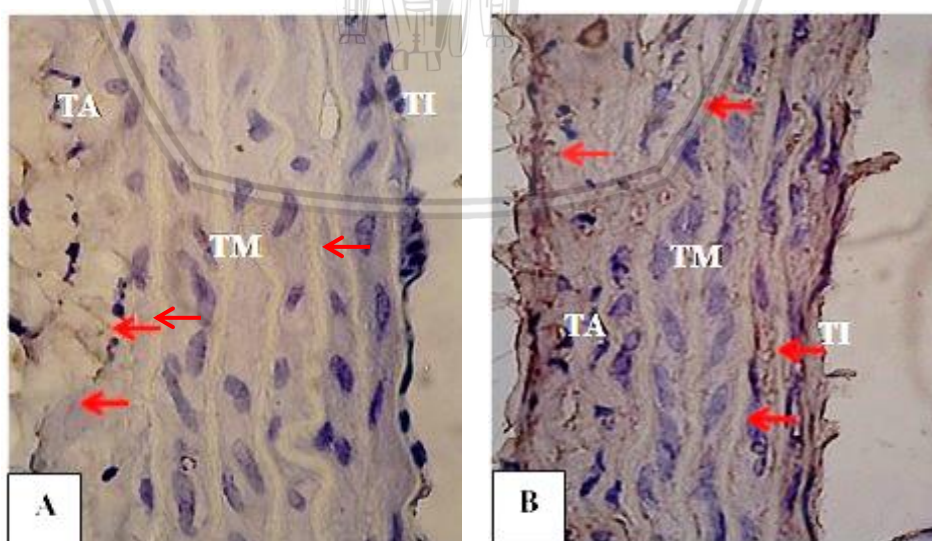
Pada penelitian ini selanjutnya dilakukan eutanasi pada tikus putih kemudian diambil organ aorta, selanjutnya dilakukan proses pewarnaan immunohistokimia dan pewarnaan HE. Pewarnaan immunihistokimia dilakukan untuk mengamati adanya Interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ).

## **5.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak Albedo Semangka Merah (*Citrullus vulgaris*) Terhadap Ekspresi IL-1 $\beta$ pada Aorta Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Model Diabetes Mellitus yang Diinduksi Streptozotocin**

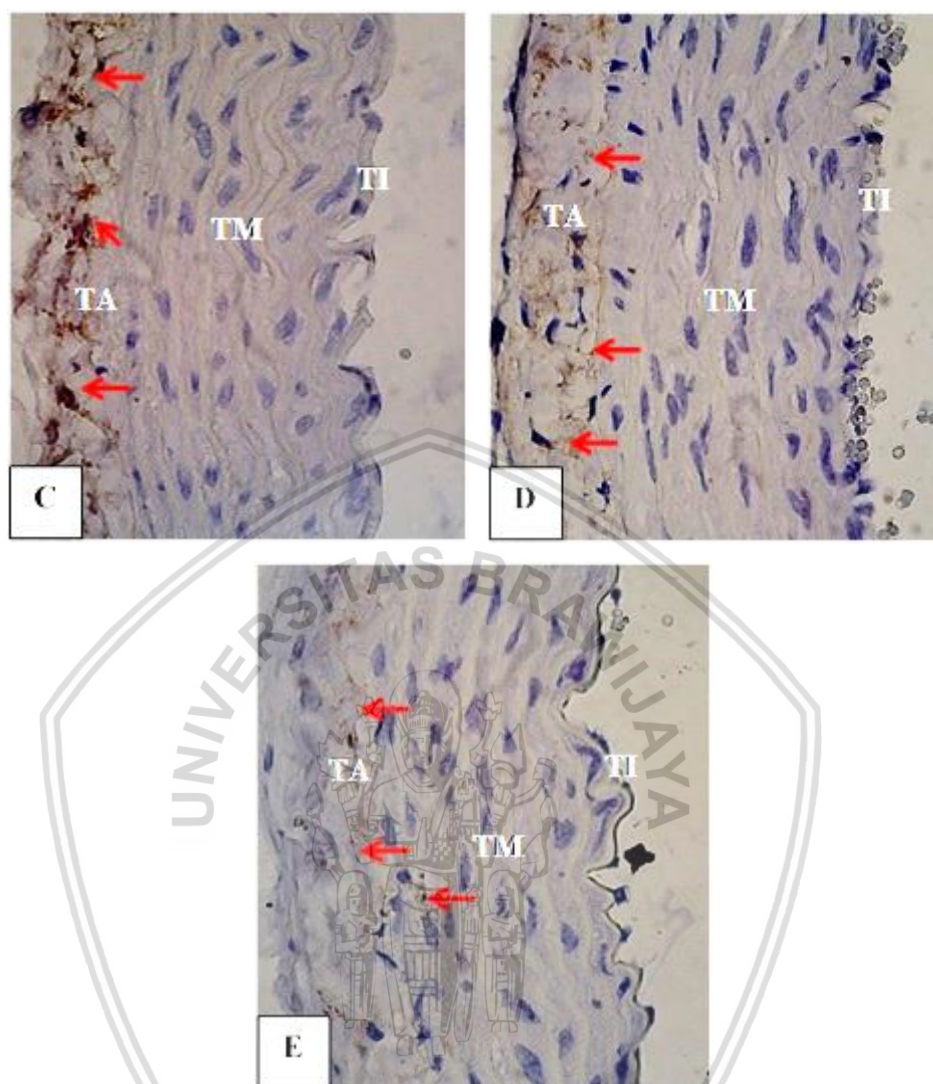
Interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ) merupakan sitokin proinflamasi yang diproduksi oleh berbagai sel monosit dan limfosit T (Eizirik dan Mandrup-Poulsen, 2001). Untuk dapat mengamati ekspresi IL-1 $\beta$  pada aorta tikus putih model diabetes mellitus tipe 1 digunakan metode immunohistokimia, hasil pewarnaan dapat ditunjukkan dengan area berwarna coklat seperti pada (**Gambar 5.1**). ekspresi IL-1 $\beta$  terlihat pada semua kelompok tidak terkecuali

pada perlakuan K- (**Gambar 5.1A**) karena secara normal IL-1 $\beta$  diproduksi oleh makrofag sebagai sistem pertahanan non spesifik. Pewarnaan imunohistokimia bertujuan untuk menghitung presentasi ekspresi IL-1 $\beta$  pada aorta., digunakan kromogen DAB (*Diaminobenzedine tetrahydrochloride*) yaitu substrat yang dapat memberikan warna coklat pada antibodi primer yaitu *anti rat* IL-1 $\beta$  dan antibodi sekunder *Rabbit anti rat IgG biotin labeled* yang berikatan.

Pada kelompok P1 yaitu terapi perlakuan dengan dosis 500 mg/kgBB, (**Gambar 5.1C**), P2 yaitu terapi perlakuan dengan dosis 1000mg/kgBB (**Gambar 5.1D**), dan P3 yaitu terapi perlakuan dengan dosis 1500mg/kgBB (**Gambar 5.1E**) masih terdapat ekspresi IL-1 $\beta$  namun terlihat adanya pengurangan intensitas warna kecoklatan dibandingkan pada kelompok K+ (**Gambar 5.1B**).







**Gambar 5.1.** Ekspresi IL-1 $\beta$  organ aorta pada masing-masing kelompok perlakuan perbesaran 400x

Keterangan : (A) Tikus kontrol negatif, (B) Tikus kontrol positif, (C) Tikus dengan dosis terapi 500mg/KgBB/hari, (D) Tikus dengan dosis terapi 1000 mg/KgBB/hari, (E) Tikus dengan dosis terapi 1500mg/KgBB/hari. (TI) = Tunika Intima, (TM) = Tunika Media, (TA) = Tunika Adventisia. (→) = ekspresi IL-1 $\beta$ .

Perhitungan ekspresi IL-1 $\beta$  pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain wistar dianalisis dengan menggunakan ANOVA dan didapatkan perbedaan hasil pengukuran ( $p < 0,05$ ) antar kelompok perlakuan, kemudian dilanjutkan dengan uji BNJ (Beda Nyata Jujur) untuk melihat perbedaan

dinyatakan dengan notasi huruf. Hasil perhitungan ekspresi IL-1 $\beta$  tersebut dapat dilihat pada **Tabel 5.2**

**Tabel 5.2** Data Perhitungan Area Ekspresi IL-1 $\beta$  pada Aorta

No	Perlakuan	Persentase area Ekspresi IL-1 $\beta$ (%) (Mean $\pm$ SD)	Peningkatan berdasarkan K-	Penurunan berdasarkan K+
1	Kontrol negatif(K-)	15,8 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	-	-
2	Kontrol positif(K+)	74,8 $\pm$ 0,12 <sup>d</sup>	373,4%	-
3	Perlakuan 1 (P1)	53,5 $\pm$ 0,09 <sup>c</sup>	238,6%	28,5%
4	Perlakuan 2 (P2)	36,5 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	131%	51,2%
5	Perlakuan 3 (P3)	18,3 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	15,8%	75,5%

Keterangan : (P1) dosis 500mg/kgBB, (P2) dosis 1000mg/kgBB, (P3) dosis 1500 mg/kgBB.

Perhitungan rata-rata ekspresi imunohistokimia IL-1 $\beta$  menggunakan *software Immunoratio*. Setelah diketahui ekspresi IL-1 $\beta$  maka dilanjutkan dengan analisis *one way* Anova (**Lampiran 10**) menggunakan *software* SPSS 24.0. Hasil yang didapat dari uji ragam ANOVA menunjukkan terdapat ekspresi IL-1 $\beta$  pada setiap kelompok perlakuan. Setelah dilakukan uji ragam ANOVA selanjutnya dilakukan uji Tukey. Hasil perhitungan rata-rata ekspresi IL-1 $\beta$  pada aorta tikus putih model diabetes mellitus tipe 1 menunjukkan bahwa ekspresi IL-1 $\beta$  tertinggi ada pada kelompok perlakuan K+ dan ekspresi IL-1 $\beta$  terendah pada kelompok K-. Melalui Hasil uji Tukey terdapat perbedaan selisih kadar IL-1 $\beta$  pada masing-masing kelompok perlakuan antara perlakuan K+ dengan kelompok perlakuan dosis 500mg/KgBB(P1), dosis 1000mg/kgBB(P2), dan dosis 1500 mg/kgBB(P3).

Ekspresi IL-1 $\beta$  pada kontrol negatif dapat ditemukan karena menurut Garlanda (2013) secara normal IL-1 $\beta$  diekspresikan pada jaringan ekstraseluler. Karena IL-1 $\beta$  berperan dalam apoptosis sel (Taburee *et al*, 2011). Peningkatan ekspresi IL-1 $\beta$  pada kelompok K<sup>+</sup> disebabkan inflamasi karena adanya radikal bebas dalam tubuh. Radikal bebas terbentuk karena adanya gangguan pada metabolisme tubuh. Menurut Smith (2005) radikal bebas terbentuk sebagai produk dari reaksi nonenzymatik dan enzymatik tubuh, radikal bebas dapat merusak susunan struktur dari membran, protein, dan DNA sel.

Kondisi DM akibat induksi STZ akan menyebabkan kerusakan sel  $\beta$  langerhans yang berakibat pada menurunnya produksi insulin sehingga tubuh tidak mampu menyerap glukosa, akibatnya sumber energi didapatkan dari proses glukoneogenesis yang menyebabkan tingginya kadar LDL dalam darah, kondisi stress oksidatif dikarenakan pembentukan ROS berlebih akan menyebabkan LDL teroksidasi. LDL teroksidasi tidak dapat dikenali oleh reseptor LDL dan tidak dapat dimetabolisme secara normal (Rufaida, 2012), sehingga nantinya ekspresi IL-1 $\beta$  meningkat agar makrofag dapat memfagositosis LDL teroksidasi.

Penurunan ekspresi IL-1 $\beta$  seperti yang ditunjukkan pada kelompok 500 mg/kgBB, dosis 1000 mg/kgBB, dan dosis 1500mg/kgBB. disebabkan karena pemberian ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) jika senyawa radikal bebas terdapat berlebih dalam tubuh atau melebihi batas kemampuan proteksi antioksidan seluler, maka dibutuhkan antioksidan tam-



bahan dari luar atau antioksidan eksogen untuk menetralkan radikal bebas yang terbentuk (Sayuti dan Yenrina, 2015).

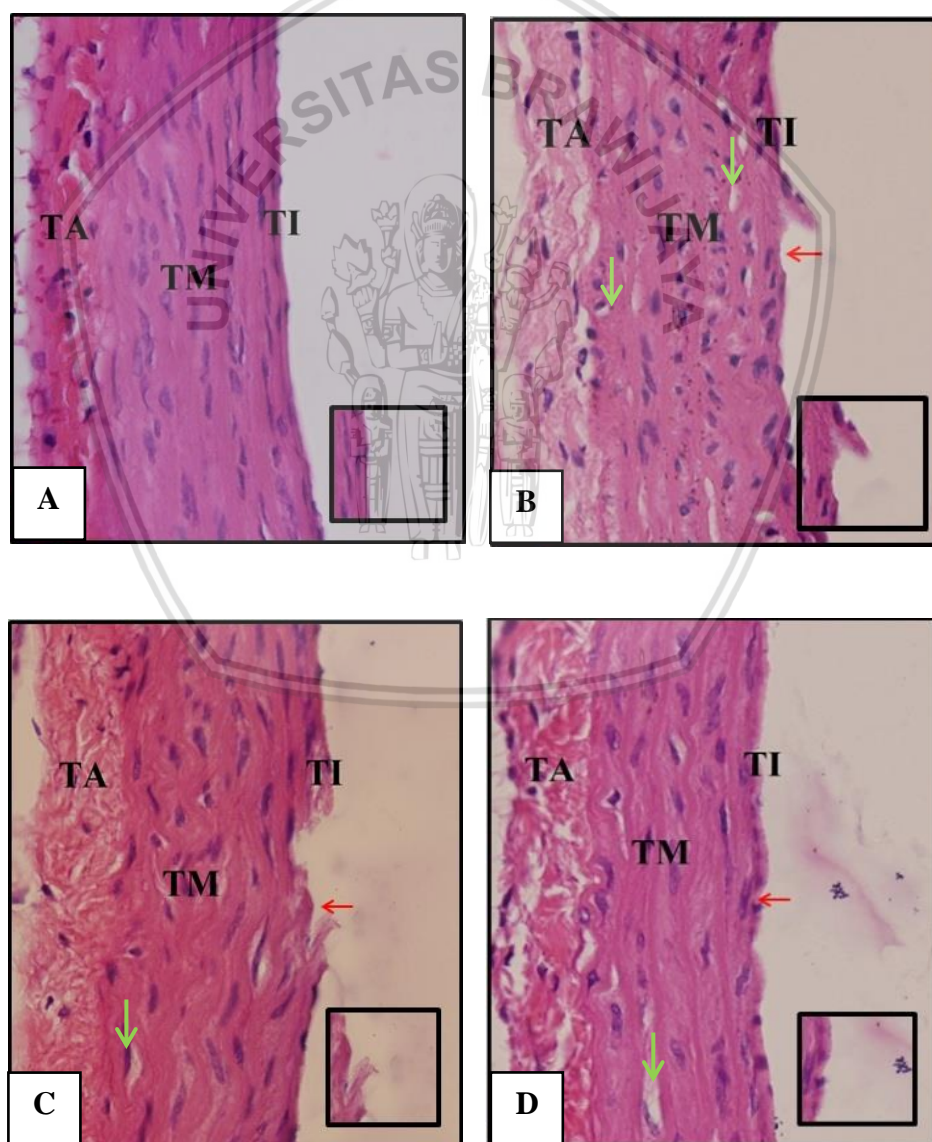
Ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) mengandung sitrulin dan vitamin yang dapat berperan sebagai antioksidan (Guoyao, *et.al.*, 2007), antioksidan yang terdapat dalam Ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) memiliki efek untuk menghambat reaksi inflamasi jaringan karena radikal bebas. Dengan cara mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksidan sehingga aktivitas senyawa oksidan tersebut dapat di hambat (Sayuti dan Yenrina, 2015). ROS yang telah dinetralkan selanjutnya tidak dapat berikatan dengan LDL, akibatnya pembentukan LDL teroksidasi dapat dicegah, sehingga reaksi inflamasi berkurang dan tubuh tidak banyak melepaskan sitokin proinflamasi, maka ekspresi IL-1 $\beta$  akan menurun.

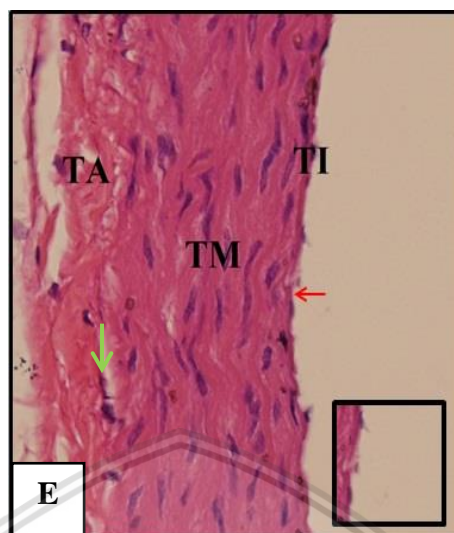
Dalam penelitian ini diketahui bahwa dosis 1500 mg/KgBB mempunyai penurunan area ekspresi IL-1 $\beta$  paling signifikan yaitu sebesar 75,5% dari kelompok kontrol positif. Sehingga dosis 1500 mg/KgBB dapat dinyatakan sebagai dosis optimal untuk menurunkan ekspresi IL-1 $\beta$  pada penelitian ini.

### **5.3 Pengaruh Pemberian Ekstrak Albedo Semangka Merah (*Citrullus vulgaris*) Terhadap Gambaran Histopatologi Aorta Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Model Diabetes Mellitus yang Diinduksi Streptozotocin**

Kerusakan aorta tikus model diabetes mellitus tipe 1 dapat dilihat melalui pewarnaan Hematoksin Eosin (HE). Kerusakan aorta yang ditandai

melalui pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE). Kerusakan aorta yang ditandai dengan adanya erosi pada sel endotel serta infiltrasi lemak pada tunika media dan tunika adventisia dapat dilihat pada tikus kelompok K<sup>+</sup> (**Gambar 5.2B**) maupun pada kelompok perlakuan P1(**Gambar 5.2C**), P2(**Gambar 5.2D**), dan P3(**Gambar 5.2E**). perbedaan antara empat kelompok ditunjukkan anak panah (→) seperti pada (**Gambar 5.2**)





**Gambar 5.2** Histopatologi Aorta dengan Pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE) perbesaran 400x

Keterangan : (A) Tikus kontrol negatif, (B) Tikus kontrol positif, (C) Tikus dengan dosis terapi 500mg/KgBB/hari, (D) Tikus dengan dosis terapi 1000 mg/KgBB/hari, (E) Tikus dengan dosis terapi 1500mg/KgBB/hari. (TI) = Tunika Intima, (TM) = Tunika Media, (TA) = Tunika Adventisia. (→) = keadaan sel endotel, (→) = Infiltrasi lemak.

Pengamatan preparat histopatologi ini dilakukan menggunakan mikroskop Olympus BX51 dengan perbesaran 400x. Jaringan aorta tikus putih (pewarnaan HE) pada tikus kelompok kontrol negatif (**Gambar 5.2A**) yang menunjukkan gambaran histologi normal, terlihat dari tidak adanya kerusakan pada tunika intima dan tidak banyak perlemakan di tunika media. Tunika intima disusun selapis sel endotel yang tersusun rapi dan halus, berbentuk pipih, dan inti sel berbentuk pipih ditengah. Sedangkan pada tunika media disusun oleh sel otot polos dengan sedikit perlemakan dan tunika adventisia tersusun oleh serabut kolagen. Hal ini sesuai dengan yang dikatakan oleh Eschenko (2005) yaitu tunika intima disusun oleh sel squamous simpleks, tunika media tersusun oleh banyak sel otot polos, dan

tunika adventisia tersusun oleh kolagen. Gambaran histopatologis aorta tikus putih model diabetes mellitus tipe 1 kelompok kontrol positif (**Gambar 5.2B**) menunjukkan adanya kerusakan sel endotel dengan bentukan lapisan sel endotel pada tunika intima kasar, inti sel endotel mengalami hipertropi, hingga terlepasnya sel endotel serta terdapat infiltrasi lemak pada tunika media yang ditunjukkan dengan terdesaknya inti sel ke tepi. Hal tersebut juga dinyatakan oleh Karunia (2014) pada aorta tikus diabetes mellitus terdapat infiltrasi lemak pada tunika media aorta. Tikus putih yang diinjeksi dengan streptozotocin akan mengalami kerusakan pada sel  $\beta$  pankreas sehingga tidak mampu memproduksi insulin, hal ini dikarenakan STZ menginduksi oksigen reaktif yang berperan dalam kerusakan sel beta pankreas. melalui peningkatan aktivitas enzim xantin oksidase sehingga kadar anion superoksida tinggi. Streptozotocin dalam hal ini menghambat siklus krebs dan menurunkan konsumsi oksigen mitokondria, akibatnya produksi Adenosine Triphosphate (ATP) pada mitokondria berkurang dan mengakibatkan pengurangan secara drastis nukleotida sel beta pankreas (Nugroho, 2006).

Penurunan produksi insulin akan mengakibatkan gangguan pada metabolisme glukosa, akibatnya tubuh tidak dapat memetabolisme glukosa sehingga digunakan sumber lain untuk memenuhi kebutuhan energi tubuh, Sumber energi didapatkan dari proses glukoneogenesis yang menyebabkan tingginya kadar LDL (*Low density lipoprotein*) dalam darah, kondisi stress oksidatif dikarenakan pembentukan ROS berlebih akan menyebabkan LDL

teroksidasi, akibatnya LDL tidak mampu dikenali oleh reseptor LDL, sehingga nantinya LDL teroksidasi ini akan menyebabkan reaksi inflamasi pada dinding pembuluh darah, LDL oksidasi akan meningkatkan ekspresi molekul adhesi seperti VCAM-1 dan P-selectin, dan akan mengadhesi limfosit dan monosit, adanya sel inflamasi memiliki efek merusak sel endotel dan menginaktifkan NO dalam endotel (Silbernagl dan Florian, 2003). Sel endotel yang rusak akan terlepas dari dinding pembuluh darah sehingga menurunkan jumlah sel endotel yang intak (Rufaida, 2012) selain itu LDL oksidasi akan menyebabkan permeabilitas sel-sel endotel terganggu, sehingga menyebabkan penimbunan lemak pada tunika media.

Hasil pengamatan pada kelompok perlakuan dosis terapi 500mg/KgBB(**Gambar 5.2C**), 1000mg/KgBB(**Gambar 5.2D**), dan 1500 mg/KgBB(**Gambar 5.2E**) ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) yang mempunyai banyak kandungan antioksidan mampu mengurangi kerusakan pada aorta tikus putih model diabetes mellitus tipe 1 . Kandungan utama ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) adalah sitrullin yang mencapai 60% atau 24,4 mg/g berat kering serta vitamin yang dapat berperan sebagai antioksidan. Antioksidan diperlukan tubuh untuk menetralkan radikal bebas, dengan melengkapi kekurangan elektron dan menghambat reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan stress oksidatif (Sayuti dan Yenrina, 2015). Gambaran histopatologi aorta dengan terapi ekstrak albedo semangka merah dosis 500 mg/KgBB/hari (**Gambar 5.2C**) menunjukkan adanya pengurangan



infiltrasi lemak pada tunika media dibandingkan dengan kontrol positif, hal ini terlihat dari inti sel yang terdesak kepinggir semakin sedikit, (**Gambar 5.2D**) aorta tikus putih dengan dosis terapi 1000mg/KgBB/hari menunjukkan tidak adanya erosi endotel pada tunika intima namun masih terlihat inti sel endotel yang mengalami hipertrofi serta pada lapisan tunika media terlihat sedikit perlemakan. (**Gambar 5.2E**) aorta tikus putih dengan dosis terapi 1500mg/kgBB/hari menunjukkan perbaikan sel endotel yang tersusun rapi dengan inti sel endotel berbentuk pipih, disertai sedikit perlemakan pada tunika media mendekati normal.

Antioksidan dalam ekstrak albedo semangka merah menetralkan radikal bebas hasil produksi reaksi enzimatis dan nonenzimatis tubuh yang terganggu akibat diabetes mellitus. Akibatnya radikal bebas dalam tubuh menurun, turunnya jumlah radikal bebas dalam tubuh mengakibatkan jumlah LDL teroksidasi berkurang, sehingga reaksi inflamasi akibat LDL teroksidasi menurun, reaksi inflamasi menurun dan mengakibatkan makrofag tidak banyak berakтивitas pada aorta. Sehingga sel endotel dapat melakukan proses metabolisme secara normal, penurunan kerusakan aorta lebih banyak terjadi pada kelompok perlakuan dosis terapi 1500 mg/KgBB dibanding dengan kelompok perlakuan dosis terapi 500 mg/KgBB dan 1000 mg/KgBB. Sehingga dapat disimpulkan dosis 1500 mg/KgBB ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) merupakan dosis optimal untuk menurunkan kerusakan pada aorta tikus putih model diabetes mellitus tipe 1 terlihat dari pengurangan kerusakan pada sel endotel serta infiltrasi lemak.

## BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1 Kesimpulan

Hasil dari penelitian yang telah disampaikan dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. Pemberian ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) dengan dosis 1500 mg/KgBB secara nyata dapat menurunkan ekspresi IL-1 $\beta$  pada aorta tikus putih model diabetes mellitus tipe 1.
2. Pemberian ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) dengan dosis 1500 mg/KgBB dapat menurunkan keparahan kerusakan aorta ditunjukkan dengan berkurangnya kerusakan sel endotel pada tunika intima

### 6.2 Saran

Saran yang dapat diberikan peneliti sehubungan dengan hasil penelitian mengenai efek terapi ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) terhadap hewan model diabetes mellitus tipe 1 yaitu diperlukan penelitian lanjutan mengenai dosis toksik terhadap ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) pada hewan coba.



## DAFTAR PUSTAKA

- Akbar, Budhi. 2010. Tumbuhan Dengan kandungan Senyawa Aktif Yang Berpotensi Sebagai Bahan Antifertilitas. Adabia Press. Jakarta.
- Ardinata, Surya Candra. 2015. Analisa Kadar Likopen Pada Semangka Dengan Menggunakan Spektrofotometer. [Tugas Akhir]. Fakultas Teknik. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Aulanni'am F., Soeatmadji A.W., Fatchiyah dan B.S. Sumitro. 2005. Detection of GAD 65 Auto Antibodies Of Type 1 Diabetes Using GAD 65-abs Reagen Produce From Bovine Brain Tissue. *Medical Journal of Indonesia*. 14:109-205
- Azhar, Lailaturrizqiyah Aninda. 2015. Yoghurt Susu Kambing Sebagai Tindakan Preventif Hiperkolesterolemia Melalui Pengukuran Kadar *Malondialdehyde* (MDA) dan Ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- $\alpha$ ) Ginjal Tikus (*Rattus norvegicus*) [Skripsi]. Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya. Malang.
- Banfield Pet Hospital. 2016. State of Pet Health 2016 Report. Portland. U.S.A
- Baqarizky, Fiizhda. 2015. Studi Awal: Gambaran Histopatologik Pankreas, Hepar, Dan Ginjal Tikus Diabetes Mellitus yang Diinduksi *Streptozotocin* Dengan Pewarnaan Hematoksin Eosin [Skripsi]. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan. UIN Syarif Hidayatullah Jakarta. Jakarta.
- Catchpole, B., Ristic J.M., & Fleeman, L.M. 2005 Canine Diabetes Mellitus: Can Old Dogs Teach Us New Trick. *Diabetologia*. 48:1948-1956.
- Deshmukh, Chinmay D., Anurekha Jam dan Mukul S.T. 2015. Phytochemical and Pharmacological Profile of *Citrullus lannatus*. *Biolife* 3(2); 483-488.
- Eizirik and Maandrup-Poulsen T. 2001. A Choice of Death The Signal Transduction of Immune Mediated Beta Cell Apoptosis. *Diabetologia* 44: 2115-2133.
- Eschenko, V., P. 2005. Atlas of Histology with Functional Correlations tenth edition. Lippincot William and Wilkin. USA. 171
- Garlanda, C., C.A., Dinarello dan J. A., Gelfand. 2013. The Interleukin-1 Family: Back to the future. NIH Public access, 2-5.

- Goldberg IJ. 2001. Diabetic dyslipidemia : causes and consequences. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 86(3): 965-971
- Goud, Busineni jayasimha., Dwarakanath., dan Swamy, B.K.Chikka. 2015. Streptozotocin A Diabetogenic Agent in Animal Model. *International Journal Of Pharmacy & Pharmaceutical Research* 3(1): 254-260.
- Guoyao, W., Julie, K.C., veazie, P.P., Dolan, K.D., Kelly, K.A dan Meininger, J.C. 2007. *Dietary supplementation with watermelon pomace juice enhances arginine vailability and ameliorates the metabolic syndromein zucker diabetic fatty rats*. American Society For Nutrition.
- Guyton, A.C., and Hall, J.E. 2006. *Textbook of Medicine Physiology*. 11<sup>th</sup> ed. Philadelphia, PA, Elsevier Saunders. USA.
- Hikmah, Nuzulul. 2014. Profil Kadar Gula Darah Diabetes Dengan metode Induksi *Stratified Dose* Streptozotocin (SD-TSZ) dan *Multi Low Dose* Streptozotocin (MLD-STZ). Fakultas Kedokteran Gigi. Universitas Jember. Jember.
- Hussain, H.,E.,M. 2002. Reverse of Diabetic Retinopathy in Streptozotocin Induced Diabetic Rats Using Traditional Indian Anti Diabetic Plan *Azadirachta indica* (L). *Indian J. Clin. Biochem*. 17:115-123
- Jusuf, A.A. 2009. *Histoteknik Dasar*. Bagian Histologi FKUI. Jakarta.
- Karunia, Bimaldy Purwa. 2014. Pengaruh Ekstrak Ethanol *Curcuma Longa L* Sebagai terapi Diabetes Mellitus 1 Pada Tikus Model Hasil Induksi Streptozotocin Terhadap Kadar Trigliserida dan Gambaran Hispotalogi Aorta [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Kevin C, Kregel, Hannah J, Zhang. 2006. An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 292:R18-R36.
- Lim, J.H., Hee J.U., Jong-Wook P., In-kyu L., dan Taeg K.K. 2009. Interleukin-1 $\beta$  Promotes the Expression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Human Aorta Smooth Muscle Cells Via Multiple Signaling Pathways. *Experimental and Molecular Medicine* 41(10): 757-764.
- Merentek, Enrico. 2006. Resistensi Insulin Pada Diabetes Mellitus Tipe 2. *Cermin Dunia Kedokteran* (150): 38-39

- Mescher, A.L. 2010. *Junquiera's Basic Histology : Twelfth Edition*. United States of America : The McGraw-Hill Companies, Inc
- Nugroho, Agung Endro. 2006. Review Hewan Percobaan Diabetes Mellitus : Patologi Dan Mekanisme Aksi Diabetogenik. *Biodiversitas* 7(4); 378-382
- Nur, Savitri N., Awaloei, Henock dan Jane Wuisan. 2016. Uji Efek Air Perasan Albedo Semangka Kuning (*Citrilus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai) terhadap Kadar Glukosa Darah pada Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi Aloksan. *e-Biomedik* 4(1) : 1-7
- Nurtamin, Tomy. 2014. Potensi *Curcumin* Untuk Mencegah Aterosklerosis. *CKD-219* 41(8): 633-634
- Ocktarini, Rizky. 2010. Pengaruh Ekstrak Herba Anting-anting (*Acalypha australis* L.) terhadap Kadar Glukosa Darah Mencit Balb/C Induksi Sterptozotocin [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Sebelas Maret
- Purwandhono, A., dan Rena Normasari. Pengaruh Pemberian Ekstrak Tauge (*Vigna radiate* (L)) Terhadap Terjadinya Stress Oksidatif Pemicu Aterosklerosis Pada Tikus Wistar Jantan yang Diberi Stress Fisik. *Journal of Agromedicine and Medical Sciences* 1(2): 26-30.
- Puspitasari Y. 2014. Kualitas Selai Lembaran Dengan Kombinasi Albedo Semangka (*Citrullus vulgaris* Schard.) dan Buah Naga Super Merah (*Hylocereus costaricensis*) [Skripsi]. Universitas Atma Jaya Yogyakarta. Yogyakarta.
- Ramos-Vara, J.A. 2005. Technical Aspect of Immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*. Vol. 42, pp. 405-426.
- Rand, JS. Fleeman LM, Farrow HA, Appleton DJ, and Lederer R. 20004. Canine and Feline Diabetes mellitus; Nature or nurture?. *Journal of Nutrition* 134(8) 2027s-2080s. USA.
- Rufaida,F., Aulanni'am dan Sri Muwarni. 2012. Profil Kadar Kolesterol Total, *Low Density Lipoprotein*(LDL), dan Gambaran Histopatologis Aorta Pada Tikus (*Rattus Norvegicus*) Hiperkolesterolemia Dengan Terapi Ekstrak Air Benalu Mangga (*Dendrophoe Pentandra*) [Skripsi]. Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya. Malang.

- Salih, D.N., K.R. Muslih, and R.S. Hamoodi. 2009. Histological Liver Change in Streptozotocin induced Diabetic Mice. *International Medical Journal Malaysia* 8(1):1-4.
- Sayuti, K., dan Rina Y. 2015. *Antioksidan Alami dan Sintetik*. Analisis University Press. Padang. 3-4
- Scanbur Research. 2010. Rat Wistar Han IGS <[http://www.scanburresearch.com/research-models/standart/rats/rat-wistar-han-igsstar-\(outbredcr1\)/](http://www.scanburresearch.com/research-models/standart/rats/rat-wistar-han-igsstar-(outbredcr1)/)> [Diakses tanggal 1 mei 2017].
- Silbernagl, S dan F, Lang. 2003. *Teks Atlas Berwarna Patofisiologi*. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta
- Smith, J.B., & Mankoewidjojo S. 1998. *Pemeliharaan, Pembiakan, dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis*. Universitas Indonesia Press. Jakarta
- Sobir dan Siregar, F.D. 2010. *Budidaya Semangka Panen 60 Hari*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Suarsana, IN., Wresdiyati, T., dan Suprayogi A. Respon Stres Oksidatif dan Pemberian Isoflavon Terhadap Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase dan Peroksidasi Lipid Pada Hati Tikus. *JITV* 18(2): 146-152.
- Sugiyanta. 2011. Pengaruh Pemberian Ekstrak Air Kulit Semangka (*Citrullus vulgaris Schard*) Terhadap Kadar Glukosa Tikus Putih (*Rattus novergicus*) yang Diinduksi Streptozotosin [Karya Tulis Ilmiah]. Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Jember
- Syukur, Cheppy dan Hermani. 2013. *Budidaya Tanaman Obat Komersial*. Penebar Swadaya. Jakarta
- Vergès, B. 2009. Lipid disorder in type I diabetes, diabetes and metabolism. 35: 353-360
- World Health Organization. 1999. *Definition, Diagnosis, and Classification Of Diabettes Meliitus and Its Complication*. Department of Non Communicable Disease Surveliance. Geneva.
- World Health Organnization. 2004. *Diabetes Action Now; An Initiative Of The World Health Organization and The International Diabetes Federation*. Marketing and Dissemination WHO. Switzerland.